

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉTUDE *IN VITRO* DE LA RÉPONSE DES MACROPHAGES
À DES PARTICULES DE MATÉRIAUX UTILISÉS DANS LES PROTHÈSES TOTALES DE
HANCHE: CÉRAMIQUES VS POLYÉTHYLÈNE

Par

ISABELLE CATELAS

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES (M.Sc.A)
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

JUILLET 1997



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-33119-9

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé

ÉTUDE *IN VITRO* DE LA RÉPONSE DES MACROPHAGES
À DES PARTICULES DE MATÉRIAUX UTILISÉS DANS LES PROTHÈSES TOTALES DE
HANCHE: CÉRAMIQUES VS POLYÉTHYLÈNE

présenté par : CATELAS Isabelle

en vue de l'obtention du diplôme de: Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. SHIRAZI-ADL Aboulfazl, PhD., membre et président de jury,

M. YAHIA L'Hocine, PhD., membre et directeur de recherche,

Mme HUK Olga, MD, membre et codirectrice de recherche,

M. MARCHAND Richard, MD, membre et codirecteur de recherche,

M. ZUKOR David, MD, membre externe.

À mes parents et toute ma famille,

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, docteur L'Hocine Yahia, pour m'avoir accueillie et permis d'effectuer ma maîtrise au sein du Groupe de Recherche en Biomécanique et Biomatériaux (GRBB) en Génie Biomédical à l'École Polytechnique. Je le remercie également pour son encadrement et ses encouragements tout au long de ces deux années, ainsi que pour m'avoir encouragée à participer à de nombreux congrès scientifiques qui m'ont à la fois aidée dans mon travail et qui ont complété ma formation.

Je tiens également à remercier vivement les docteurs Olga Huk et Richard Marchand pour leur collaboration, leurs conseils et leur soutien tout au long de ce travail, et sans qui ce projet n'aurait pu prendre autant d'ampleur. Un grand merci aussi pour m'avoir permis de travailler dans leurs laboratoires respectifs au Lady Davis Institute et à l'hôpital Ste-Justine.

Je désire également assurer le docteur Alain Petit, avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler durant la seconde année de ma maîtrise, de toute ma reconnaissance pour son aide, son dévouement, sa patience et l'optimisme dont il sait toujours faire preuve.

Je voudrais exprimer ma gratitude aux docteurs Aboulfazl Shirazi-Adl et David Zukor qui ont accepté d'évaluer mon travail en faisant partie de mon jury.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes qui m'ont apporté une aide scientifique ou technique tout au long de ces deux années, et avec qui j'ai longtemps travaillé:

- M. Réal Meilleur qui, avec beaucoup de patience, m'a enseigné et fait aimer la cytométrie en flux,
- M. Daniel Roussety pour son dévouement et son courage au sein du laboratoire de Séro-Immunologie à l'hôpital Ste-Justine,
- Les technicien(nes) du laboratoire de Séro-Immunologie, avec qui j'ai partagé de nombreuses heures de travail,
- Mesdames Gaetane En Guen et Marie Blagdon pour m'avoir permis l'accès au département d'hématologie, où j'ai terminé mes manipulations en cytométrie en flux,
- Mme Souad Rhalmi pour sa gentillesse et son dévouement.

Je tiens à remercier l'unité orthopédique de l'Université McGill pour le financement du projet, ainsi que le CRSNG et le gouvernement du Canada (Ministère des Affaires Étrangères et du Commerce International) pour leurs subventions.

Un grand merci aussi à tous les étudiants et employés du GRBB pour toutes les heures passées ensemble et tous les petits coups de main indispensables...

Enfin, merci à toute ma famille et particulièrement à mes parents pour leur aide et leur soutien qui, même à distance, me sont extrêmement précieux.

Résumé

Le descellement aseptique, initié par des débris d'usure, est la cause principale des échecs à long terme des Prothèses Totales de Hanche (PTHs). Parmi ces débris d'usure, le polyéthylène est considéré comme le principal responsable de l'ostéolyse périprothétique suite à une réaction inflammatoire. De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont analysé l'influence du type de débris sur la réaction cellulaire, mais très peu se sont penchées sur l'étude des débris céramiques. Une étude antérieure réalisée dans notre laboratoire sur des pseudomembranes de PTHs descellées a montré que le couple céramique-céramique (CC) générait moins de débris et une réaction inflammatoire moins intense que le couple métal-polyéthylène (MPe). Cependant, cette étude a aussi montré que lorsqu'elles étaient présentes en grande quantité, les particules de céramique, considérées comme bioinertes, génèrent aussi une réaction inflammatoire intense. Afin d'éliminer les facteurs confondants inhérents à une étude *in vivo*, nous avons mis en place un modèle de culture cellulaire *in vitro*, afin d'étudier la réaction des macrophages à des particules de céramique (Alumine (Al_2O_3) et zircone (ZrO_2)) et polyéthylène (PE) dans un environnement contrôlé. Les effets de taille, concentration et composition des particules ont été analysés. Le but ultime de cette étude est de comparer les couples MPe et CC en terme de réaction inflammatoire et essayer de comprendre et moduler le descellement aseptique des PTHs en contrôlant l'ostéolyse périprothétique.

Des tests de phagocytose et de cytotoxicité (mortalité cellulaire) ont été réalisés par cytométrie en flux. Cette technique nous a permis de mettre en place un nouveau modèle d'évaluation de la biocompatibilité de n'importe quel biomatériau à l'état particulaire. Les médiateurs inflammatoires (TNF- α , IL-1 α et β) ont été dosés par tests ELISA, et la mortalité cellulaire par apoptose a été démontrée par microscopie à fluorescence et fragmentation d'ADN.

Tous les résultats, autant par cytométrie en flux que par microscopie à fluorescence et fragmentation d'ADN, ont montré que la taille et la concentration des débris sont deux facteurs fondamentaux influençant la réponse cellulaire. Ceci suggère que les macrophages répondent plutôt à un volume particulaire qu'à un nombre absolu de particules par macrophage. Les recherches sur le design de prothèses totales de hanche doivent donc s'orienter vers des matériaux plus résistants à l'usure afin de minimiser le nombre de débris. En ce sens, le couple CC présente un avantage par rapport au couple MPe. Concernant l'effet de composition, nous n'avons pas montré de différence significative entre Al₂O₃ et ZrO₂. Ceci signifie qu'en terme de réaction inflammatoire, il ne semble pas y avoir de préférence quant à l'utilisation de l'alumine ou de la zircone. Par contre, la comparaison des particules d'alumine et de polyéthylène de 4.5 μ m a montré que l'alumine était plus facilement phagocytable que le polyéthylène *in vitro*, mais que le polyéthylène entraînait une sécrétion de médiateurs inflammatoires (en l'occurrence TNF- α) plus importante que l'alumine, aux mêmes tailles et concentrations.

Ceci suggère que le polyéthylène pourrait entraîner une ostéolyse périprothétique plus importante que l'alumine. Enfin, les résultats d'analyse de mortalité ont démontré la présence d'apoptose dans nos cultures cellulaires, directement reliée à la taille et la concentration des particules. Ces résultats ouvrent la porte vers des traitements thérapeutiques de l'ostéolyse périprothétique par contrôle des événements cellulaires menant à la résorption osseuse.

En conclusion, les résultats de cette étude montrent que le couple CC paraît supérieur au couple MPe en terme de réaction inflammatoire, et possède en plus une meilleure résistance à l'usure. Les recherches futures doivent donc s'orienter maintenant vers les problèmes mécaniques à l'interface os-céramique (mauvaise transmission des contraintes due à une trop grande rigidité et une faible ténacité des céramiques qui risquent d'augmenter les risques de contraintes de cisaillement et de microfractures).

Abstract

Aseptic loosening, initiated by wear particles is the most common cause of total hip prosthesis failure. Polyethylene debris has been the main culprit in initiating periprosthetic osteolysis following an inflammatory response. Several *in vivo* and *in vitro* studies have already analyzed the effect of debris composition on cellular response, but very few analyzed ceramic debris. A previous study in our laboratory on pseudomembranes from failed Total Hip Arthroplasties (THAs) demonstrated that ceramic-ceramic (CC) joint couple generated less debris and a less intense inflammatory response compared to metal-polyethylene (MPe) joint couple. However, when present in large concentrations, these ceramic particles can initiate an inflammatory reaction. In order to eliminate confounding factors inherent to *in vivo* studies, we designed an *in vitro* model to analyze macrophage response to ceramic (Al_2O_3 and ZrO_2) and polyethylene (PE) particles in a controlled environment. Effects of particle size, concentration and composition have been analyzed. The ultimate goal of this study is to compare MPe and CC joint couples in terms of inflammatory response, and to open doors for regulation of aseptic loosening by modulation of osteolysis.

Phagocytosis and cytotoxicity (cell mortality) tests have been conducted using flow cytometry. This technique allowed us to design a new model for the evaluation of

cellular response to any biomaterials at the particulate level. Inflammatory mediators (TNF- α , IL-1 α and β) have been measured by ELISA tests, and cell death by apoptosis has been demonstrated by fluorescence microscopy and DNA fragmentation.

Our results using flow cytometry as well as fluorescence microscopy and DNA fragmentation showed that particle size and concentration are two fundamental parameters influencing cellular response. These results suggest that macrophages respond to overall particle volume rather than absolute particle numbers. Therefore, future prosthetic design efforts should focus on wear resistant interfaces to reduce debris. To this end, the CC joint couple has major advantages over the MPe joint couple. With regards to composition, we did not demonstrate any significant difference between Al₂O₃ and ZrO₂. On the other hand, our results showed that Al₂O₃ was more easily phagocytosed than PE when controlling for size (4.5 μ m) and concentration. However, macrophages stimulated with PE generated a higher level of TNF- α release than macrophages stimulated with Al₂O₃ at the same size and concentration, increasing the risk of osteolysis *in vivo*. These results support the superiority of the CC joint couple as an articulating interface in terms of inflammatory response. Lastly, our results on cell mortality demonstrated the presence of apoptosis in our cell culture model, directly related to particle size and concentration. These results open doors for targeting specific points in the regulation of osteolysis by modulation of the active cellular events leading to apoptosis.

In conclusion, the results of this study support the superiority of the CC joint couple compared to the MPe joint couple in terms of inflammatory reaction, in addition to its higher wear resistance. Armed with encouraging results with regards to the reaction of macrophages to ceramic particles, future research on the mechanical interaction of the bone-ceramic interface are now justified in order to improve current ceramic prosthetic designs.

Table des matières

Dédicace	iv
Remerciements	v
Résumé	viii
Abstract.....	xi
Table des matières.....	xiv
Liste des figures.....	xix
Liste des sigles et abréviations	xxvi
Introduction.....	1
CHAPITRE 1: Mécanismes conduisant à l'ostéolyse périprosthétique.....	5
1.1 CONCEPT	5
1.2 DÉBRIS D'USURE ET OSTÉOLYSE PÉRIPROSTHÉTIQUE: IMPORTANCE DE LA TAILLE, LA CONCENTRATION ET LA COMPOSITION.....	9
1.3 LIEN ENTRE MÉDIATEURS INFLAMMATOIRES ET OSTÉOLYSE PÉRIPROSTHÉTIQUE:.....	11
1.4 IMPORTANCE DU TYPE DE MORTALITÉ CELLULAIRE.....	14

CHAPITRE 2: Biocompatibilité des céramiques: des années 70 à nos

jours.....18

2.1 RÉPONSE BIOLOGIQUE AUX CÉRAMIQUES À L'ÉTAT MASSIF.....20

2.2 RÉPONSE BIOLOGIQUE AUX CÉRAMIQUES SOUS FORME PARTICULAIRE.....22

CHAPITRE 3: Méthodologies utilisées pour l'étude de la réponse cellulaire

aux particules26

3.1 PARTICULES26

3.1.1 Choix des particules26

3.1.2 Préparation des particules27

3.1.3 Stérilisation et mise en contact avec les macrophages28

3.1.4 Concentrations des particules.....29

3.2 LIGNÉE CELLULAIRE30

3.2.1 Choix de la lignée.....30

3.2.2 Cultures31

3.3 CYTOMÉTRIE EN FLUX.....32

3.3.1 Principe du cytomètre32

3.3.2 Tests de phagocytose:36

3.3.3 Tests de cytotoxicité.....38

3.4 MÉDIATEURS INFLAMMATOIRES.....40

3.4.1 Dosage d'IL-1 α41

3.4.2 Dosage d'IL-1 β42

3.4.3 Dosage de TNF- α44

3.5 TYPE DE MORTALITÉ.....45

3.5.1 Analyse de la morphologie cellulaire.....	45
3.5.2 Analyse de la fragmentation de l'ADN (DNA laddering).....	46

CHAPITRE 4: Étude de la réponse *in vitro* des macrophages à des particules de céramiques et de polyéthylène (Article 1)47

4.1 SYNOPSIS	50
4.2 INTRODUCTION.....	51
4.3 MATERIALS AND METHODS	53
4.3.1 Particles	53
4.3.2 Cell culture	54
4.3.3 Flow cytometry analysis.....	55
4.3.4 Inflammatory mediator tests.....	58
4.3.5 Statistical analysis	59
4.4 RESULTS	59
4.4.1 Phagocytosis.....	59
4.4.2 Cytotoxicity	62
4.4.3 Inflammatory mediators	63
4.5 DISCUSSION.....	64
4.6 CONCLUSION.....	68
4.7 REFERENCES	70

CHAPITRE 5: Étude de la cytotoxicité et des médiateurs inflammatoires	
(Article 2)	75
5.1 ABSTRACT	77
5.2 INTRODUCTION	78
5.3 MATERIALS AND METHODS	80
5.3.1 Particles	80
5.3.2 Cell culture	80
5.3.3 Flow cytometry	81
5.3.4 Inflammatory mediator tests.....	82
5.3.5 Statistical analysis	83
5.4 RESULTS	83
5.4.1 Cytotoxicity	83
5.4.2 Inflammatory mediators	84
5.5 DISCUSSION.....	87
5.6 REFERENCES	92
 CHAPITRE 6: Étude de la mortalité des macrophages par apoptose	
(Article 3)	97
6.1 SUMMARY	99
6.2 INTRODUCTION	100
6.3 MATERIALS AND METHODS	102
6.3.1 Particles	102
6.3.2 Cell culture	102
6.3.3 Fluorescence microscopy	103

6.3.4 DNA laddering	103
6.4 RESULTS	104
6.4.1 Fluorescence microscopy	104
6.4.2 DNA laddering	108
6.5 DISCUSSION.....	109
6.6 REFERENCES.....	114
 CHAPITRE 7: Discussion générale.....	120
7.1 LA CYTOMÉTRIE: PERFORMANCES ET LIMITES.....	121
7.2 RÉSULTATS DE PHAGOCYTOSE, CYTOTOXICITÉ ET MÉDIATEURS INFLAMMATOIRES: LIEN AVEC LE MÉCANISME DE DESCÈLEMENT DES PTHs.	126
7.3 LES CYTOKINES: MARQUEURS DE L'ACTIVITÉ DES MACROPHAGES.....	131
7.4 L'APOPTOSE: UN MOYEN DE TRAITEMENT THÉRAPEUTIQUE DE L'OSTÉOLYSE PÉRIPROSTHÉTIQUE?	132
 Conclusion et perspectives	138
Références	141

Liste des figures

Figure 1.1	Prothèse totale de hanche CC (Céraver-Ostéal): a) Queue métallique en alliage titane, b) Tête en alumine, c) Cupule en alumine, d) Metalback poreux pour la fixation de la cupule, e) Cupule en PE	6
Figure 1.2	Illustration des changements morphologiques d'une cellule nécrotique	16
Figure 1.3	Illustration des changements morphologiques d'une cellule apoptotique	17
Figure 3.1	Illustration du fonctionnement du cytomètre	32
Figure 3.2	Illustration de la diffraction du faisceau laser sur une cellule	34
Figure 3.3	Graphique illustrant la répartition des particules ou des cellules en fonction de leur taille (FSC) et leur granularité (SSC)	34

Figure 3.4	Graphique illustrant la répartition des cellules en fonction de leur longueur d'onde	35
Figure 3.5	Acquisition de données par cytométrie en flux pour les tests de phagocytose (avec R1: somme des cellules et R2: cellules qui ont changé de taille et/ou granularité après ingestion des particules)	37
Figure 3.6	Acquisition de données par cytométrie en flux pour les tests de cytotoxicité (avec marqueur M1: cellules vivantes et marqueur M2: cellules mortes)	40
Figure 3.7	Exemple de courbe standard typique (IL-1 α)	42
Figure 3.8	Exemple de courbe standard typique (IL-1 β)	43
Figure 3.9	Exemple de courbe standard typique (TNF- α)	45
Figure 4.1	<p>Flow cytometric data acquisition of phagocytosis tests.</p> <p>J774 macrophages were incubated 24 hours without particles (control - Figure 4.1A) and with Al₂O₃ at the concentration of 250 particles per cell and at 0.6 μm (Figure 4.1B). R1 and R2 are manually defined windows, where R1 represents the sum of the cells and R2 the cells that have</p>	

	changed in granularity and/or size after particle ingestion (stimulated cells)	56
Figure 4.2	Flow cytometric data acquisition of cytotoxicity tests. J774 macrophages were incubated 24 hours without particles (control - Figure 4.2A), and with Al ₂ O ₃ at the concentration of 250 particles per cell and at 2.4 µm (Figure 4.2B). Markers 1 and 2 (M1 and M2) define the range of live and dead cells respectively	58
Figure 4.3	Kinetics of phagocytosis. J774 macrophages were incubated 24 hours with increasing concentrations of Al ₂ O ₃ at 1.3 µm for varying periods of time. Phagocytosis index (Figure 4.3A) and particle ingestion index (Figure 4.3B) were measured as described in Materials and Methods. Results are the mean of 2 experiments performed in duplicate	60
Figure 4.4	Effects of particle size and concentration on phagocytosis index. J774 macrophages were incubated 24 hours in presence of increasing sizes and concentrations of Al ₂ O ₃ particles. Results are the mean of 4 experiments performed in duplicate	61

Figure 4.5	Effects of particle composition on phagocytosis index. J774 macrophages were incubated 24 hours in presence of increasing concentrations of Al_2O_3 and ZrO_2 particles at 0.6 μm (Figure 5A) or Al_2O_3 and HDP particles at 4.5 μm (Figure 5B). Results are the mean of 4 experiments performed in duplicate	62
Figure 4.6	Effects of particle size and concentration on cell mortality. J774 macrophages were incubated 24 hours in presence of increasing sizes and concentrations of Al_2O_3 particles. Results are the mean of 4 experiments performed in duplicate	63
Figure 4.7	Stimulation of $\text{TNF-}\alpha$ release by ceramic and HDP particles. J774 macrophages were incubated 24 hours at 3 different concentrations of Al_2O_3 and ZrO_2 particles at 0.6 μm (Figure 7A), or Al_2O_3 and HDP particles at 4.5 μm (Figure 7B). Results are the mean of 3 experiments performed in duplicate	64
Figure 5.1	Flow cytometric data acquisition of cytotoxicity tests. J774 macrophages were incubated 24 hours without particles (control - Figure 5.2A), and with Al_2O_3 at the concentration of	

250 particles per cell and at 2.4 μm (Figure 5.2B). Markers 1 and 2 (M1 and M2) define the range of live and dead cells respectively 82

Figure 5.2 **Effect of Al_2O_3 particle size and concentration on cell mortality.** J774 macrophages were incubated 24 hours in presence of increasing concentrations of Al_2O_3 at 1.3 μm and 2.4 μm . Results are the mean of 3 experiments performed in duplicate 84

Figure 5.3 **Effect of Al_2O_3 particle size on $\text{TNF-}\alpha$ release.** J774 macrophages were incubated with Al_2O_3 particles at sizes varying from 0.6 to 4.5 μm and at the concentration of 150 particles per macrophage. Results are the mean of 3 experiments performed in duplicate 85

Figure 5.4 **Effect of Al_2O_3 particle concentration on $\text{TNF-}\alpha$ release.** J774 macrophages were incubated with Al_2O_3 particles at 1.3 μm and at concentrations vaying from 5 to 1500 particles per macrophage. Results are the mean of 2 experiments performed in duplicate 86

Figure 5.5	Effect of particle composition on TNF-α release. J774 macrophages were incubated with Al ₂ O ₃ and ZrO ₂ particles at 0.6 μ m and concentrations up to 2500 particles per macrophage (Figure 5.5A), and with Al ₂ O ₃ and HDP particles at 4.5 μ m and concentrations up to 250 particles per macrophage (Figure 5.5B). Results are the mean of 3 experiments performed in duplicate	87
Figure 6.1	<i>In vitro</i> stained J774 macrophages with propidium iodide (PI): effect of particle size and concentration. Figure 6.1A shows control cells (macrophages without particles) incubated during 24 hours. Figure 6.1B shows macrophages incubated with Al ₂ O ₃ particles at 0.6 μ m and at the concentration of 150 particles per macrophage	105
Figure 6.2	Effect of particle concentration on cell morphology. Figures 6.2A and 6.2B present J774 macrophages incubated with Al ₂ O ₃ particles at 1.3 μ m and at the concentrations of 80 and 150 particles per macrophage respectively	107
Figure 6.3	Effect of Al₂O₃ particle size on DNA laddering. J774 macrophages were incubated with Al ₂ O ₃ particles at different	

sizes varying from 0.6 μm to 4.5 μm at the concentration of 150 particles per macrophage	108
---	-----

Figure 6.4

Effect of Al_2O_3 particle concentration on DNA laddering.

J774 macrophages were incubated with Al_2O_3 particles at 1.3 μm and at concentrations varying from 5 to 500 particles per macrophage	109
--	-----

Liste des sigles et abréviations

AC	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
Al ₂ O ₃	Céramique d'alumine
CC	Céramique-céramique (couple de friction)
EGF	"Epidermal Growth Factor" (Facteur de Croissance Épidermique)
EtO	Oxyde d'éthylène
FL	Fluorescence
FSC	Forward Scatter (cytométrie en flux)
GM-CSF	"Granulocyte macrophage-colony stimulating factor"
HDP	"High Density Polyethylene"
HRP	Horseradish peroxidase
IL-1	Interleukine-1
IL-6	Interleukine-6
MPe	Métal-Polyéthylène (couple de friction)
PBS	Phosphate Buffer Solution
PE	Polyéthylène
PGDF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes

PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PI	Propidium iodide
PM	Pseudomembrane
PMMA	Polyméthylméthacrylate
PTH	Prothèse Totale de Hanche
SSC	Side Scatter (cytométrie en flux)
TMB	Tétraméthylbenzidine
TNF- α	"Tumor Necrosis Factor" (Facteur de Nécrose Tumorale)
THA	"Total Hip Arthroplasty"
UV	Ultraviolet
ZrO ₂	Céramique de zircone

Introduction

Plus de 300 000 prothèses articulaires ont été posées en Amérique du Nord en 1992 et 30% de ces interventions ont été réalisées sur des personnes de moins de 65 ans. Bien que la réussite de ces chirurgies soit bonne, des échecs dus à un descellement aseptique de la prothèse apparaissent parfois après 10 ans ou plus d'implantation. En raison d'une augmentation de l'espérance de vie, il est donc essentiel d'augmenter la durée de vie de ces implants. La recherche de matériaux de meilleure qualité de friction et l'étude de l'effet des débris d'usure sont les seuls moyens de parvenir à contrôler thérapeutiquement l'ostéolyse périprosthétique, voire même de la supprimer. Les mécanismes conduisant à ce phénomène sont en fait multiples et complexes, d'origine mécanique et/ou biologique. Parmi ces mécanismes dont nous reparlerons plus en détail au cours du chapitre 1, les débris d'usure ont souvent été reconnus pour jouer un rôle prépondérant (Glant et Jacobs, 1994; Harada *et al.*, 1994, 1995; Shanbhag *et al.*, 1994). En effet, ces débris stimulent les macrophages et les fibroblastes qui sécrètent alors des médiateurs biochimiques entraînant l'ostéolyse périprosthétique, et ainsi le descellement de la prothèse. Le choix des matériaux est donc fondamental afin de réduire au maximum le taux d'usure et ainsi la génération de débris. Parmi ces débris d'usure, le polyéthylène a été et est encore considéré comme le principal responsable de l'ostéolyse périprosthétique. Aussi, alors que le couple métal-polyéthylène (MPe), introduit dès les

années 60 par John Charnley, reste préférentiellement utilisé en Amérique du Nord, le couple céramique-céramique (CC) et plus particulièrement alumine-alumine, reconnu pour sa forte résistance à l'usure, fut introduit sur le marché européen dans les années 70. Depuis, d'autres couples ont également fait leur entrée sur le marché (alumine-polyéthylène, zircone-polyéthylène). Nous aurons l'occasion de discuter plus en détail de l'introduction des céramiques dans le domaine biomédical et de leur biocompatibilité lors du chapitre 2. Ainsi, la présente étude s'inscrit dans le cadre plus vaste de comparaison des 2 couples de friction MPe et CC. Peu d'études ont été réalisées sur le couple de frottement CC. Une étude antérieure réalisée dans notre laboratoire (Lerouge *et al.*, 1996, 1997), visant à caractériser les débris d'usure retrouvés dans les pseudomembranes de hanche descellées, a montré que le couple CC entraînait moins de débris d'usure et une réaction inflammatoire moins intense en comparaison au couple MPe. Cependant, cette étude a aussi montré que lorsqu'elles étaient présentes en grande quantité, les particules de céramiques pouvaient aussi générer une réaction inflammatoire intense. Notre hypothèse de travail est donc que les débris de céramique, présents en moins grande quantité que les débris polyéthylène, provoquent une réaction "à corps étranger" moins intense que les débris de polyéthylène.

Afin d'éliminer les facteurs confondants inhérents aux études *in vivo*, nous avons mis au point un modèle *in vitro* afin de mieux comprendre la réaction cellulaire à des particules de céramiques et de polyéthylène, depuis leur phagocytose par les macrophages jusqu'à

la mort cellulaire et/ou le relargage de médiateurs inflammatoires conduisant à l'ostéolyse périprothétique. En travaillant dans un environnement contrôlé, nous avons pu mesurer l'influence des différents paramètres des particules tels que la taille, la concentration et la composition en comparant la réaction cellulaire aux différentes particules dans les mêmes conditions. Des tests de phagocytose et cytotoxicité ont été réalisés par cytométrie en flux, dont les principes et la méthodologie sont présentés dans le chapitre 3 alors que l'ensemble des résultats obtenus sont présentés dans le chapitre 4 (article 1). Différents médiateurs inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β et TNF- α) reconnus pour jouer un rôle prépondérant dans l'ostéolyse périprothétique, ont été dosés par tests ELISA. Les résultats sont présentés dans le chapitre 4 (article 2), en corrélation aux résultats de mortalité cellulaire obtenus par cytométrie en flux.

Enfin, le but ultime des recherches effectuées sur les mécanismes conduisant à l'ostéolyse périprothétique est de parvenir à contrôler ce phénomène afin d'essayer de le traiter thérapeutiquement. C'est pourquoi nous avons analysé la mortalité cellulaire par apoptose dans nos cultures. L'apoptose est en effet un type de mortalité génétiquement contrôlé (et possiblement contrôlable), et sa présence dans nos cultures cellulaires après incubation avec les particules pourrait ouvrir des portes vers une régulation thérapeutique du phénomène d'ostéolyse périprothétique. Les résultats sont présentés dans le chapitre 4 (article 3).

À la lumière de nos résultats, la discussion générale sur l'ensemble de notre travail, présentée au chapitre 5, nous permettra d'évaluer la validité de nos méthodes, de tirer des conclusions quant aux mécanismes de descellement des PTHs et ouvrir les portes vers des recherches futures en vue de traiter thérapeutiquement l'ostéolyse périprothétique.

CHAPITRE 1: Mécanismes conduisant à l'ostéolyse périprothétique

Ce chapitre vise à dresser l'état des connaissances sur les mécanismes conduisant à l'ostéolyse périprothétique. Nous y introduirons les principaux paramètres jouant un rôle prépondérant dans ce phénomène et dont nous reparlerons tout au long de notre étude.

1.1 CONCEPT

La prothèse standard est faite de deux composantes: une tige rattachée à une tête fémorale, et une cupule (Figure 1.1). Ces deux composantes s'articulent comme une balle et un cotyle ("socket"). La cupule peut être en céramique ou en polyéthylène (de très haut poids moléculaire) et est insérée dans le bassin pour remplacer l'acétabulum dégénéré. Elle est fixée au moyen d'un "metalback". La tige insérée dans le fémur peut être faite en alliages (aciers inoxydables, CoCr ou Ti), alors que la tête fémorale est plutôt faite soit en CoCr s'articulant sur une cupule en polyéthylène (PE), soit en céramique s'articulant sur une cupule céramique. La fixation de ces deux composantes peut se faire avec ou sans ciment.

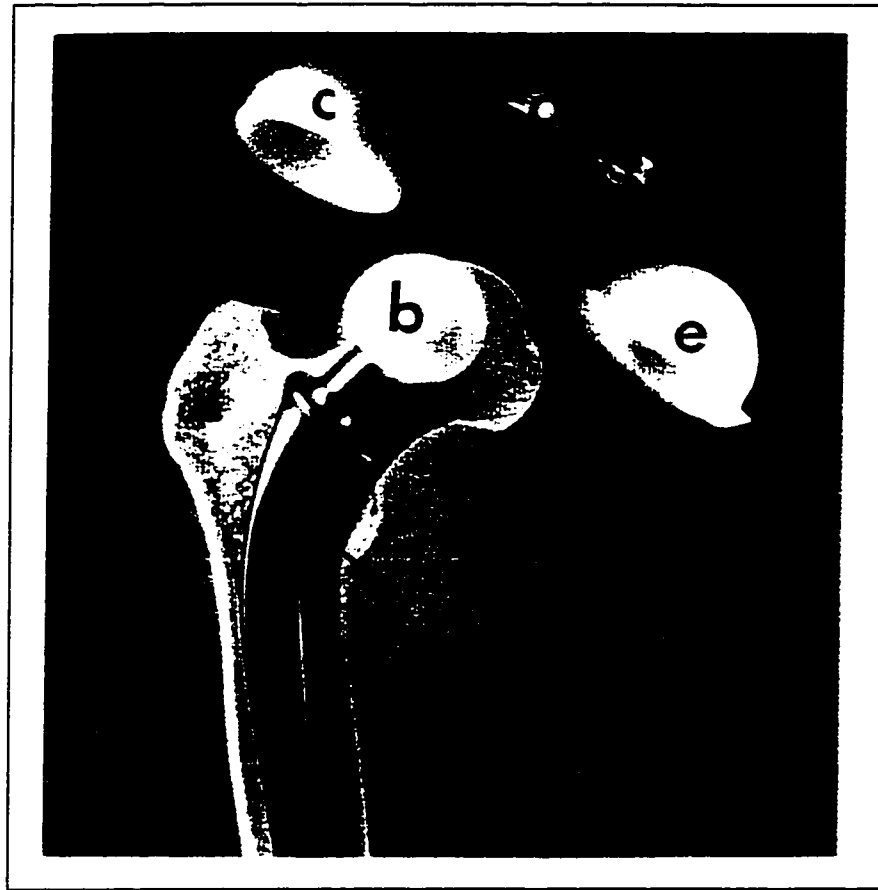


Figure 1.1: *Prothèse totale de hanche CC (Céraver-Ostéal)*

a) Queue métallique en alliage titane, b) Tête en alumine, c) Cupule en alumine, d) Metalback poreux pour la fixation de la cupule, e) Cupule en PE.

L'ostéolyse périprothétique n'est pas un nouveau concept. Ce phénomène a fait l'objet de très nombreuses recherches, particulièrement par l'analyse des tissus périprothétiques qui ont permis d'identifier les principaux éléments de ce mécanisme. En fait, dès 1968, Sir John Charnley reconnut son apparence radiographique. Ce n'est qu'en 1974 que Willert et ses collègues définirent l'ostéolyse périprothétique comme

une réponse inflammatoire à des débris d'usure. Elle se traduit par une perte d'os autour de la prothèse, entraînant un mouvement de la prothèse sous une charge relativement faible. Des douleurs surviennent alors, rendant nécessaire le remplacement des composantes descellées. La révision des prothèses descellées a montré la présence d'un tissu fibreux et inflammatoire à la place de l'os résorbé autour de l'articulation (Goldring *et al.*, 1983; Spector *et al.*, 1991).

Les mécanismes conduisant à l'ostéolyse périprothétique sont multiples, d'ordre mécanique et biologique. Le ciment servant à la fixation des prothèses fut souvent le principal accusé dans l'initiation de l'ostéolyse d'où le terme "maladie du ciment" (ou "cement disease") énoncé par Jones et Hungerford en 1987. Pourtant, après implantation de prothèses non cimentées, le phénomène persistait, et ce même après seulement deux ans d'implantation (Huk *et al.*, 1994). La présence d'ostéolyse autour d'implants non cimentés a permis à la communauté orthopédique de réaliser que la cause principale de ce problème était la présence de débris d'usure, et l'expression de "maladie du ciment" a alors été remplacée par l'expression "maladie des débris" (Manley et Serekian, 1994). Ces débris polymériques, métalliques ou céramiques peuvent provenir de deux types d'usure:

- frottement des deux surfaces articulaires de l'implant, générant des débris de PE, métal ou céramique, selon la composition de la prothèse,
- frottement de la prothèse contre le ciment de fixation ou l'os, générant des débris de ciment ou de ses composants.

De nombreuses études *in vivo* se sont penchées sur la caractérisation de ces débris d'usure (Campbell *et al.*, 1995; Lerouge *et al.*, 1997; Margevicius *et al.*, 1994; Schmalzried *et al.*, 1994; Shanbhag *et al.*, 1994; Pizzoferrato *et al.*, 1993). On les retrouve dans le tissu fibreux entourant la prothèse (Goldring *et al.* 1983; Goodman *et al.*, 1990; Tornhill *et al.*, 1990), en présence de nombreuses cellules dont 60 à 80% sont des macrophages ou cellules géantes, 15 à 30% des fibroblastes et 5% des lymphocytes T (Jiranek *et al.*, 1993). La présence massive de macrophages et cellules géantes a été observée dans de nombreuses études histologiques de la membrane périprothétique de hanches descellées (Goldring *et al.* 1983; Goodman *et al.*, 1989; Tornhill *et al.*, 1990). Les études *in vivo* ont donc clairement montré et caractérisé les débris d'usure présents dans les pseudomembranes de hanche descellées. Elles ont aussi montré l'influence de la présence de ces débris sur la réponse des macrophages, cellules majoritairement présentes au site de l'inflammation, et qui, stimulées, relarguent des médiateurs inflammatoires agissant directement sur l'ostéolyse périprothétique (Chiba *et al.*, 1994; Jiranek *et al.*, 1993; Shanbhag *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1996). Pourtant, étant donnés les multiples facteurs confondants inhérents aux études *in vivo*, aucune d'entre elles n'a pu montrer quantitativement l'influence des différents paramètres particuliers, tels que la taille, la concentration et la composition des particules. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier la réponse *in vitro* des macrophages à différents types de particules dans un environnement contrôlé.

1.2 DÉBRIS D'USURE ET OSTÉOLYSE PÉRIPROSTHÉTIQUE: IMPORTANCE DE LA TAILLE, LA CONCENTRATION ET LA COMPOSITION

L'influence des débris d'usure sur la réponse cellulaire peut se diviser en plusieurs étapes:

- 1- reconnaissance des substances étrangères,
- 2- phagocytose des particules reconnues comme corps étranger,
- 3- réponse cellulaire pouvant mener à la mort de la cellule et/ou la sécrétion de médiateurs inflammatoires influençant la résorption osseuse autour de la prothèse.

La réponse cellulaire à des particules étrangères ne peut être bien comprise qu'en analysant chacune de ces étapes. De nombreuses recherches utilisant des méthodes microscopiques ont étudié la stimulation des macrophages par les débris, montrant que la réponse inflammatoire et la résorption osseuse sont bien liées au processus initial de phagocytose (Benz *et al.*, 1994; Maloney *et al.*, 1993; Pazzaglia *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1992). Dépendamment de la taille des débris, on distingue deux types d'internalisation: la pinocytose ($< 1 \mu\text{m}$) et la phagocytose ($> 1 \mu\text{m}$), caractérisées par la formation de lysosomes dans la cellule dans le but d'essayer de digérer les particules ingérées. Le processus d'internalisation et de réponse cellulaire varie donc en fonction de la taille des particules. De même, une particule de plus grosse taille risque d'être plus

endommageante pour la cellule qu'une particule de petite taille. L'influence d'une taille inférieure à 1 μm n'a jusqu'à maintenant été que très peu étudiée (Shanbhag *et al.*, 1994), alors que la majorité des débris observés *in vivo* sont submicroniques (Campbell *et al.*, 1995, Lerouge *et al.*, 1996; Schmalzried *et al.*, 1994). D'autres études étudiant ce paramètre ont considéré des tailles démesurément trop grandes, jusqu'à 1000 μm (Nakashima *et al.*, 1995), et donc bien supérieures à la limite de l'échelle phagocytable. Horowitz *et al.* (1993) proposent une taille limite d'échelle phagocytable de 12 μm .

Un deuxième facteur important à considérer influençant la réponse cellulaire est la concentration en débris (Gonzalez *et al.*, 1995; Howie *et al.*, 1994). Des études antérieures réalisées dans notre laboratoire sur des pseudomembranes de prothèses descellées (Lerouge *et al.*, 1997) ont montré que les céramiques, pourtant considérées comme bioinertes, pouvaient entraîner une réponse inflammatoire intense si elles étaient présentes en grande quantité. La majorité des études *in vitro* évaluant l'influence de ce paramètre considèrent un poids de particules par ml, indépendamment de la composition. Pourtant, chaque matériau possède une densité différente. Aussi, afin de comparer la réponse cellulaire à différents matériaux dans les mêmes concentrations, il est nécessaire de considérer un nombre de particules par macrophage, calculé à partir de la densité de chaque matériau.

Enfin, un troisième et dernier paramètre que nous considérerons dans notre étude est l'influence de la composition des particules. Bien que la taille et la concentration

semblent être deux facteurs essentiels, la comparaison de la réponse cellulaire *in vitro* en présence de particules de polyéthylène et de céramique n'a jamais été étudiée. Une seule étude réalisée sur l'alumine par Nakashima *et al.* (1995), montre que les céramiques (alumine et hydroxyapatite) entraînent une sécrétion de TNF- α , IL-1 α et IL-6.

Il serait aussi intéressant d'analyser les effets de la morphologie et de l'énergie de surface, qui dépend à la fois de la composition et de la taille des particules. En effet, des études de caractérisation des débris *in vivo* ont montré que les particules de PE avaient plutôt une forme aiguille, alors que les particules céramiques étaient plus rondes (Lerouge *et al.*, 1996). Cependant, la difficulté de fabriquer ou se procurer des particules ne variant que pour ces paramètres ne nous a pas permis de les prendre en considération.

1.3 LIEN ENTRE MÉDIATEURS INFLAMMATOIRES ET OSTÉOLYSE PÉRIPROSTHÉTIQUE:

L'activation des macrophages a été maintes fois démontrée *in vitro* (Bennett *et al.*, 1991; Glant et Jacobs, 1994; Goldring *et al.*, 1990; Goldring *et al.*, 1992; Harada *et al.*, 1995; Marcinkiewicz *et al.*, 1991). Ces essais *in vitro* ont ainsi permis de mesurer les conséquences de cette activation, soit la sécrétion de médiateurs inflammatoires influençant la résorption osseuse. L'action des médiateurs inflammatoires sur la résorption osseuse est cependant très complexe. Ils peuvent jouer un rôle d'activation des

ostéoclastes ou de maturation de cellules précurseurs, ou encore inhiber la formation osseuse par les ostéoblastes (McDonald et Gowen, 1992). Souvent même, ils auront un effet couplé, agissant sur la sécrétion d'autres médiateurs. La définition des médiateurs inflammatoires agissant sur l'ostéolyse périprothétique reste donc sujet à controverse. L'interleukine 1 ($IL-1\alpha$ et β), la prostaglandine E_2 (PGE_2) et le Facteur de Nécrose Tumorale ($TNF-\alpha$) sont les plus couramment étudiés de ces médiateurs. Certaines études ont aussi étudié l' $IL-6$, la collagénase, les facteurs de croissance épidermique (EGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PGDF) et le "granulocyte macrophage-colony stimulating factor" (GM-CSF). Murray *et al.* (1990) ont montré que l'activation cellulaire entraînait une plus grande résorption osseuse qu'une libération de PGE_2 , prouvant ainsi l'existence d'autres stimulateurs plus importants que PGE_2 . Shanbhag *et al.* (1994) ont montré une corrélation entre le ^{45}Ca relargué dans les cultures de calvaria (mesure caractéristique de l'activité ostéolytique) et $IL-1$ mais pas avec PGE_2 . Chiba *et al.* (1994) ont montré l'association de $IL-1$, $TNF-\alpha$ et $IL-6$ avec l'ostéolyse, alors que d'autres auteurs (Algan *et al.*, 1996; Horowitz *et al.*, 1995) ont montré que l'activation des macrophages par des particules de polyméthylméthacrylate (PMMA) entraînait une stimulation de la sécrétion de $TNF-\alpha$, mais pas de PGE_2 ni d' $IL-1\alpha$ et β . D'autre part, de nombreuses études ont montré qu'il existait un lien direct entre la stimulation des macrophages par des débris d'usure et la hausse de médiateurs inflammatoires comme $IL-1\alpha$ et β , $IL-6$, $TNF-\alpha$ et PGE_2 (Blaine *et al.*, 1996; Chiba *et al.*, 1994). Cependant, la PGE_2 (hormone locale à courte durée de vie et reconnue pour son action de résorption)

est très souvent sujet à controverse: une hausse significative a été montrée par différentes études en présence de débris de différentes compositions (Haynes *et al.*, 1993; Nakashima *et al.*, 1995; Shanbhag *et al.*, 1994), alors que d'autres ont montré une hausse négligeable de PGE₂ par les cellules inflammatoires (Algan *et al.*, 1996; Horowitz *et al.*, 1993). C'est pourquoi nous avons limité notre étude à IL-1 α et β et à TNF- α , directement impliqués dans le phénomène de résorption osseuse.

IL-1 α est une interleukine produite principalement par des monocytes / macrophages activés. Elle est reconnue pour entraîner des réponses de l'hôte à une infection. Des études *in vivo* ont détecté la présence d'IL-1 α lors d'ostéolyse (Chiba *et al.*, 1994; Shanbhag *et al.*, 1995). Par ailleurs, Nakashima *et al.* (1995) ont démontré la présence de cette interleukine *in vitro* après incubation de macrophages J774 avec des particules d'alumine. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier ce médiateur inflammatoire dans le cadre de notre étude.

IL-1 β , une interleukine produite par toutes les cellules nucléées de l'organisme, est reconnue pour rendre stimulable toute cellule susceptible d'être utile dans l'inflammation. Elle joue donc un rôle important dans la réaction inflammatoire au niveau des tissus périprothétiques. Certains auteurs (Chiba *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1994) ont montré un taux élevé d'IL-1 β *in vivo* lors d'ostéolyse fémorale. Des études de résorption *in vitro* (Glant *et al.*, 1993; Shanbhag *et al.*, 1992, 1994) ont aussi montré une corrélation entre la résorption *in vitro* et la concentration d'IL-1 β .

TNF- α est un facteur de croissance reconnu pour augmenter la résorption osseuse par libération des ions constituant de l'os et du cartilage. Il est aussi reconnu pour contribuer à la réorganisation de la circulation des cellules et des produits lors d'une inflammation. Il est donc essentiel de doser cette cytokine dans le cadre de notre étude. Ce médiateur serait l'un des stimuli primaires dans le déclenchement de l'inflammation selon Horowitz *et al.* (1993). Il joue un rôle de pivot direct (Xu *et al.*, 1996) régulant l'IL-1, l'IL-6 et le GM-CSF, et un rôle indirect dans l'activation et le recrutement des ostéoclastes. On le retrouve très souvent dans les pseudomembranes de hanches descellées (Xu *et al.*, 1996; Horowitz *et al.*, 1995).

1.4 IMPORTANCE DU TYPE DE MORTALITÉ CELLULAIRE

La mort cellulaire peut être accidentelle ou programmée dans un organisme multicellulaire. L'existence d'un "programme de suicide" a été proposé dans les cellules vertébrées. Ce programme peut être activé quand la mort de la cellule concernée est désirable pour le "bien-être" des autres (Cohen, 1993; Raff, 1992). Ce type de mortalité est appelé apoptose, à l'opposition de la nécrose, qui apparaît plutôt suite à de sévères et brutaux changements dans l'environnement de la cellule (ischémie, hyperthermie brutale, traumatisme physique ou chimique). Ce concept de mortalité programmée n'est pas récent. Déjà en 1972, Kerr *et al.* avaient défini l'apoptose comme un phénomène biologique fondamental ayant de nombreuses répercussions sur la cinétique tissulaire et

avaient énoncé les principales étapes de changements morphologiques d'une cellule apoptotique. Mais l'intérêt récent porté par les biologistes dans quelque domaine que ce soit à l'évaluation de la mortalité cellulaire par apoptose est dû au fait que ce type de mortalité est un phénomène actif et sujet à régulation génétique (Eastman, 1993; Steller, 1995). Il serait en effet intéressant de pouvoir contrôler ce type de mortalité en développant des drogues qui pourraient agir sur les composants moléculaires de la machinerie conduisant à la mort de la cellule. Ainsi, par extrapolation en orthopédie et particulièrement pour les prothèses totales de hanche, la présence de ce type de mortalité cellulaire peut ouvrir des portes à des recherches sur la modulation thérapeutique de l'ostéolyse périprothétique.

Caractérisation des deux types de mortalité

Afin de reconnaître les cellules apoptotiques des cellules nécrotiques, il est nécessaire de connaître les principales caractéristiques morphologiques de ces deux types de cellules.

Nécrose

Les premiers changements de morphologie cellulaire apparaissent au niveau de la forme et la fonction des mitochondries. Une cellule nécrotique devient rapidement incapable de maintenir l'homéostasie. La membrane plasmatique peut être le principal site de dommage. Perdant sa capacité de réguler sa pression osmotique, la cellule gonfle et se

rompt, entraînant un déversement de son contenu dans le milieu extracellulaire (libération des médiateurs lipidiques (leukotriènes, prostaglandines) présents dans la cellule, et libération des médiateurs protéiques (TNF- α , interleukines) ayant été synthétisés avant la mort de la cellule). L'éclatement de la cellule nécrotique est souvent associée à une réaction des cellules environnantes, provoquant une réaction inflammatoire locale. Cette réaction inflammatoire locale peut être accompagnée d'une production de lymphokines et d'une réaction systémique.

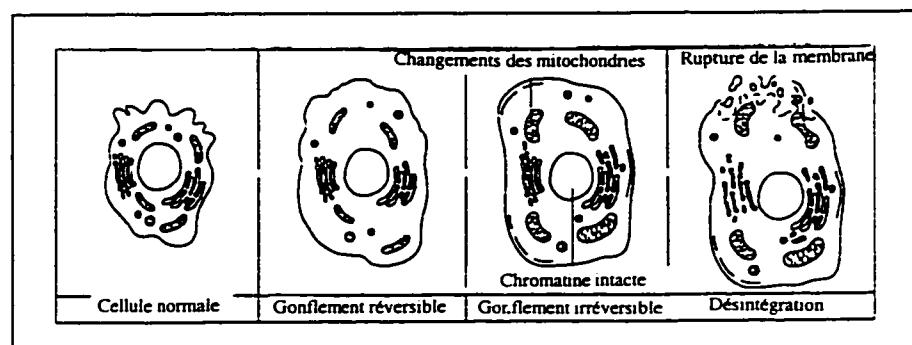


Figure 1.2: Illustration des changements morphologiques d'une cellule nécrotique

Apoptose

Le procédé est ici plus complexe. Dans un premier temps, la cellule apoptotique perd du volume. On assiste à une condensation de la cellule et du noyau. Les organelles cytoplasmiques sont condensées et la chromatine est agrégée. Peu à peu, le noyau s'agrége lui aussi, pour finalement se casser en petites sphères, appelés "corps apoptotiques". De l'ADN est probablement perdu lors de la génération des corps

apoptotiques. De plus, l'apoptose est souvent associée à l'activation de nucléases qui dégradent l'ADN en larges fragments et subséquemment en très petits fragments oligonucléosomiaux. Le processus suppose la mise en place d'une "machinerie" intracellulaire et son activation avant la destruction du noyau. S'il n'y a pas de lésions des cellules environnantes, la réaction inflammatoire au pourtour est en général faible ou inexistante.

Dans un second temps, les corps apoptotiques sont phagocytés par les autres cellules pour être finalement dégradés par les enzymes lysosomales dérivées des cellules phagocytaires. Ainsi, par observation de la morphologie des cellules (par microscopie à fluorescence par exemple) et par analyse de l'ADN ("DNA laddering"), nous pourrions démontrer la présence d'apoptose dans nos cultures après incubation des cellules avec les particules.

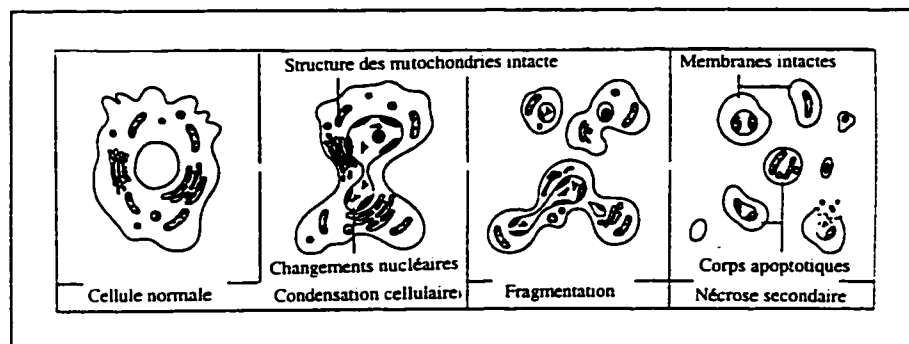


Figure 1.3: Illustration des changements morphologiques d'une cellule apoptotique

CHAPITRE 2: Biocompatibilité des céramiques: des années 70 à nos jours

Le but de ce chapitre est de dresser un bilan des connaissances sur la biocompatibilité des céramiques, depuis leur introduction dans le domaine du biomédical jusqu'à nos jours. Nous y analyserons différentes études *in vivo* ayant utilisé ce matériau, ce qui nous permettra de mieux situer notre étude *in vitro*.

Les premières prothèses de hanche (prothèses de Charnley) furent implantées dans les années 60, et sont encore implantées de nos jours. Faites en métal-polyéthylène, elles génèrent cependant une grande quantité de débris de polyéthylène (PE), reconnus comme étant le principal responsable de l'ostéolyse périprothétique. Afin de minimiser le nombre de débris d'usure, les céramiques et plus particulièrement l'alumine ont été introduites dans le domaine biomédical au début des années 70 en Europe (Boutin *et al.*, 1972). En effet, le taux d'usure du couple céramique-céramique (CC) a été calculé théoriquement de l'ordre de $0.025 \mu\text{m}/\text{an}$, alors que le couple métal-polyéthylène (MPe) génère un taux d'usure de $100 \mu\text{m}/\text{an}$. Aussi, leur excellente résistance à l'usure et leur biocompatibilité font des céramiques un matériau de premier choix. Cependant, la première phase de développement de ce matériau en orthopédie connut des échecs. Le produit n'était pas complètement optimisé, avec une taille de grain variable et irrégulière

(jusqu'à 100 μm) et un système de fixation rudimentaire entre la tête et la tige fémorale (Grelsamer *et al.*, 1991). Aussi, après quelques échecs dramatiques en Amérique du Nord liés essentiellement à des problèmes de design et de fixation, la céramique fut rejetée massivement aux États-Unis (Mahoney *et al.*, 1990; O'Leary *et al.*, 1988). Cependant, les propriétés des céramiques ont été considérablement améliorées par la suite en Europe au cours des années 70-80. La faible réaction tissulaire observée après implantation de céramiques a permis de qualifier ce matériau de bioinerte. En fait, le caractère bioinerte des céramiques est probablement lié au fait que ce matériau est dans son état d'oxydation maximal et est ainsi thermodynamiquement stable. Au niveau moléculaire, les liaisons interatomiques fortes font que les céramiques sont extrêmement dures, leur donnant une stabilité chimique remarquable en plus d'une résistance à l'usure et à la corrosion, points faibles des matériaux métalliques et des polymères. La suite de ce chapitre fait un bilan d'études *in vivo* sur la biocompatibilité des céramiques à l'état massif et particulaire. En effet, la réponse biologique à n'importe quel biomatériau est fonction de sa compatibilité biomécanique, de sa réactivité de surface (qui inclut l'énergie de surface, la mouillabilité (hydrophobe, hydrophile), et la charge de surface), mais aussi de sa forme physique (massif ou particulaire). La forme de l'implant et sa texture auront ainsi une influence considérable sur la réaction cellulaire à corps étranger.

2.1 RÉPONSE BIOLOGIQUE AUX CÉRAMIQUES À L'ÉTAT MASSIF

La biocompatibilité a été définie comme l'habilité d'un matériau à performer avec une réponse de l'hôte appropriée dans une application spécifique. La réponse de l'hôte dépend essentiellement de la capacité du matériau à adsorber des protéines sur sa surface. Cette adsorption peut entraîner une croissance osseuse sur la surface ou, dans d'autres cas, peut conduire à une activation des différents systèmes plasmatiques conduisant à une réponse inflammatoire. En ce qui concerne les biocéramiques, et plus particulièrement l'alumine, la structure ionique de ce matériau crée une surface hydrophile et, en relation à son énergie de surface, la mouillabilité de l'alumine est supérieure à celle des métaux et polymères utilisés en orthopédie. Cependant, contrairement à ces derniers matériaux, aucune étude n'a été réalisée sur l'adsorption de protéines plasmatiques sur des surfaces céramiques. Une seule étude (Agathopoulos *et al.*, 1995) a analysé la mouillabilité et les interactions à l'interface des systèmes biocéramiques-liquides corporels. En utilisant des mesures d'angles de contact, les auteurs ont calculé l'énergie d'interaction entre l'alumine ou la zircone et les liquides corporels (eau, liquide synovial, sérum, plasma, sang total). Ils ont montré que dans le cas d'oxydes polycristallins comme l' Al_2O_3 et ZrO_2 dont l'énergie de surface est importante, une faible adhérence est observée à l'interface matériau-fluide. Cette faible adhérence serait due à la mise en jeu de forces de dispersion et expliquerait la relative biocompatibilité de ces matériaux.

Afin d'évaluer la réponse des tissus mous à l'alumine ou la zircone à l'état massif, des disques et cylindres ont été implantés dans des muscles (Christel *et al.*, 1989; Harms *et al.*, 1979). Une observation au microscope a montré la présence d'une capsule (pseudomembrane (PM)), se transformant avec le temps en une membrane fibreuse et dense, contenant des macrophages. En 1987, Ryu *et al.* ont même démontré l'apparition d'un sarcome après 15 mois d'implantation d'une prothèse céramique non cimentée. Ce résultat, s'ajoutant à d'autres échecs après implantation de prothèses CC (Boutin et Blanquaert, 1981; Mahoney *et al.*, 1990; O'Leary *et al.*, 1988; Plitz *et al.*, 1981) a contribué au rejet massif du couple CC par la communauté orthopédique de l'Amérique du Nord. Cependant, nous devons noter que l'étude reportée par Ryu *et al.* en 1987 fut critiquée par Christel *et al.* en 1992 qui ont démontré que le sarcome décrit par Ryu *et al.* était plutôt associé à des vis métalliques implantées quelques années auparavant plutôt qu'à la prothèse céramique implantée seulement un an avant la détection du sarcome.

Malgré ces quelques résultats contradictoires, il en ressort que les céramiques, bien que reconnus pour leur caractère bioinerte, peuvent tout de même entraîner une réponse inflammatoire se traduisant par l'apparition d'une pseudomembrane entourant l'implant. D'autre part, aucune différence significative n'est apparue entre l'alumine et la zircone après implantation de ces deux matériaux à l'état massif. Par contre, la zircone semble offrir de meilleures propriétés mécaniques que l'alumine: meilleure résistance à la fracture, module d'élasticité plus faible que celui de l'alumine (200 GPa contre 350 GPa). Ces propriétés mécaniques supérieures pourraient réduire en partie le problème de

transmission des contraintes à l'interface os-implant dû au module d'élasticité trop élevé des céramiques, et ainsi réduire en partie une des principales cause de descellement des cupules céramiques (Sedel *et al.*, 1994).

Si l'on regarde maintenant la biocompatibilité des céramiques à l'état massif en terme de réponse osseuse plutôt qu'en terme de réponse des tissus mous, Christel *et al.* (1992) ont constaté une formation rapide d'os poreux apparaissant après implantation de céramiques dans des os de différents animaux, et se transformant en os mature après 2 à 4 mois. D'autre part, les auteurs ont aussi constaté que la membrane fibreuse entourant l'implant céramique avait une épaisseur plus faible que celle entourant des implants en acier inoxydable. Enfin, en conditions de chargement, l'alumine permettait une bonne ostéointégration en compression.

2.2 RÉPONSE BIOLOGIQUE AUX CÉRAMIQUES SOUS FORME PARTICULAIRE

Étant donné leur excellentes caractéristiques de résistance à l'usure et leur caractère relativement inerte en comparaison aux autres matériaux, il a été supposé que les débris de céramique étaient moins importants et entraînaient une réaction inflammatoire périprothétique moins intense que les débris de métal ou de polyéthylène. Une comparaison histologique de pseudomembranes de prothèses CC et MPE descellées a été réalisée dans notre laboratoire (Lerouge *et al.*, 1996, 1997). Dans cette étude, 39 PMs

provenant de l'interface cupule-os ont été analysées. Sur ces 39 PMs, 17 provenaient de prothèses CC et 22 de prothèses MPe. Dans le groupe des prothèses CC, 12 avaient eu une cupule cimentée et 5 non cimentée. Dans le groupe des prothèses MPe, 18 avaient été cimentées et 4 avaient été fixées au moyen d'un "metalback" poreux. Les résultats ont montré que le nombre moyen de macrophages, cellules géantes et autres types cellulaires dans chaque groupe observé de PMs était moins important dans le groupe des prothèses CC que dans le groupe des prothèses MPe. Cependant, si l'on excluait les cupules non cimentées du groupe des prothèses CC, il n'y avait alors plus de différence significative dans la réponse inflammatoire par rapport au groupe MPe. L'analyse histologique a montré que les particules de céramique n'étaient jamais associées aux cellules géantes, alors que les particules de métal et polyéthylène induisaient une réaction des macrophages et cellules géantes, dépendamment de la taille des débris. En effet, la majorité des particules de céramique étaient d'une taille inférieure à $1\text{ }\mu\text{m}$ ($0.28 \pm 0.08\text{ }\mu\text{m}$ pour ZrO_2 , $0.44\text{ }\mu\text{m} \pm 0.25\text{ }\mu\text{m}$ pour Al_2O_3) et donc dans l'échelle phagocytable pour les macrophages, alors que les particules de PE, plus allongées, avaient souvent une taille supérieure, devenant seulement phagocytées par les cellules géantes. Des particules de ZrO_2 (ici agent radioopacifiant du ciment de fixation) ont été trouvées dans 10 des 12 spécimens de prothèses cimentées, avec une concentration 6.3 fois plus importante que celle des débris d' Al_2O_3 . Cette étude histologique montre donc une réaction cellulaire non seulement à des débris métalliques, mais aussi à des débris de céramiques qui, lorsqu'ils sont présents en grande quantité, peuvent initier une réaction

inflammatoire intense. Cependant, de part la présence de débris de ZrO_2 en grande concentration par rapport aux débris d' Al_2O_3 dans le cas de prothèses cimentées, cette étude ne permet pas de comparer la capacité à induire une réaction inflammatoire de ces deux matériaux en concentrations égales.

C'est pourquoi des études *in vitro* sont nécessaires afin de travailler dans un environnement contrôlé, et évaluer la réponse des macrophages à des particules d' Al_2O_3 et ZrO_2 à tailles et concentrations connues. Pizzoferrato *et al.* (1987) ont par exemple démontré la présence d'une réaction histiocytique importante à des taux élevés de particules d' Al_2O_3 provenant de PMs de 24 révisions de THAs pour lesquelles au moins une des composantes articulaires était en Al_2O_3 . D'autres études ont analysé des biopsies humaines de prothèses alumine-alumine descellées ou non (Boutin *et al.*, 1988). Dans le cas des prothèses non descellées, une couche de tissu connectif fine et organisée a pu être observée entre la céramique et l'os. Peu de particules d'usure en alumine étaient présentes et la réaction macrophagique était faible. Au contraire, dans le cas des prothèses descellées, des particules étaient accumulées au niveau de la capsule, entraînant une réaction inflammatoire nette avec présence de macrophages relarguant des médiateurs inflammatoires.

Même si des études ont montré que la réaction inflammatoire autour des prothèses CC était moins intense que celle observée autour des prothèses MPe, il n'empêche que toutes ces études démontrent la capacité des particules de céramique à induire une réaction

histiocytique et que cette réaction est fonction du nombre de débris observés. L'avantage majeure des céramiques est que le couple CC génère moins de débris que le couple MPe, et que les débris de céramiques sont ronds et donc probablement moins endommageants pour les cellules que les débris de PE, qui ont une forme plus allongée en forme d'aiguille (Lerouge *et al.*, 1996). Ces différences en quantité, taille et forme des débris peuvent peut-être expliquer la différence de réaction inflammatoire observée autour des prothèses MPe et CC. Néanmoins, la réaction inflammatoire à des débris de céramique et PE n'a jamais été comparée aux mêmes tailles, et concentrations. C'est dans ce but que des modèles de cultures *in vitro* sont développés, et c'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude.

CHAPITRE 3: Méthodologies utilisées pour l'étude de la réponse cellulaire aux particules

Le but de ce chapitre est de présenter le matériel et surtout les différentes techniques employées. Une meilleure compréhension des principes de ces méthodes nous permettra ainsi de mieux comprendre les résultats obtenus.

3.1 PARTICULES

3.1.1 Choix des particules

La zircone partiellement stabilisée à l'ittrium a été choisie pour plusieurs raisons:

- ce matériau, retrouvé lors de l'étude de pseudomembranes de prothèses descellées, est l'un des constituants du ciment permettant la fixation des prothèses,
- il a été projeté comme futur matériau de choix pour des applications orthopédiques (Yaparpalvi *et al.*, 1994).

La taille des particules de ce matériau a été choisie de l'ordre de $0.6\ \mu\text{m}$, taille voisine de celle des particules de zircone retrouvée lors de l'analyse des pseudomembranes (Lerouge *et al*, 1996).

Les différentes alumines ont été choisies essentiellement pour leur haute pureté (99,9 %). En effet, d'après les normes ISO 6474, le taux d' Al_2O_3 doit être supérieur ou égal à 99,5%, l'additif de frittage MgO inférieur à 0,3% et la teneur en impuretés, $\text{SiO}_2 + \text{CaO}$ et oxydes de métaux alcalins doit être inférieur ou égal à 0,1%. Or, si on regarde la composition des alumines choisies (c.f. descriptif des matériaux, chapitre 3), nous nous apercevons que ces conditions sont satisfaites.

Enfin, nous avons choisi d'utiliser du polyéthylène haute densité plutôt que du PE à très haut poids moléculaire (UHMWPe) qui, à la taille voulue (de l'ordre du micron), se retrouve sous forme de monocristal et possède alors un caractère très inflammable. De plus, les particules d'UHMWPe de cette taille possèdent les mêmes propriétés que le polyéthylène de haute densité. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser le PE haute densité, plus facile à obtenir commercialement.

3.1.2 Préparation des particules

Les particules d'alumine Al_2O_3 (Alcan (Jonquières, Québec, Canada): $0.6, 2.4\ \mu\text{m}$, Alcoa (Bauxite, AK, USA): $1.3\ \mu\text{m}$, et Durmax (Chatellerault, France): $4.5\ \mu\text{m}$), de zircone

ZrO₂ (Unitec Ceramics (Stafford, England): 0.6 µm) et de polyéthylène haute densité (PE haute densité) (Shamrock (Newark, NJ, USA): 4.7 µm) nous ont été fournies par les manufacturiers, directement sous forme de poudre. Les caractéristiques de ces différents matériaux sont données par le tableau 3.1 suivant:

	Al₂O₃	ZrO₂	PE haute densité
Composition	Al ₂ O ₃ : 99.9 % Na ₂ O: 0.05 % SiO ₂ : 0.01 à 0.02 % Fe ₂ O ₃ : 0.01 à 0.02 % CaO: 0.04% B ₂ O ₃ : 0.003 %	ZrO ₂ + HfO ₂ : 93.5 % Y ₂ O ₃ : 6% MgO: < 0.1% Al ₂ O ₃ : < 0.1 % SiO ₂ : < 0.15 % Fe ₂ O ₃ : < 0.1 % Na ₂ O: < 0.1 %	non communiquée
Taille (µm)	0.6, 1.3, 2.4, 4.5	0.6	4.7
Densité	≈ 3.83 g/cm ³	≈ 6 g/cm ³	≈ 0.95 g/cm ³

Tableau 3.1: *Caractéristiques des différents matériaux*

3.1.3 Stérilisation et mise en contact avec les macrophages

Plusieurs procédés peuvent être employés pour la stérilisation:

- utilisation de la chaleur (vapeur saturée (autoclave) ou sèche),
- utilisation d'agents chimiques,

- utilisation de radiations: Rg, irradiation par UV,
- utilisation de gaz (EtO ou formaldéhyde).

Disposant d'un matériau thermosensible (polyéthylène), nous avons choisi d'utiliser la stérilisation par gaz (oxyde d'éthylène: EtO), qui permet une stérilisation à faible coût et à basse température.

3.1.4 Concentrations des particules

Tests de phagocytose et cytotoxicité

Étant données les valeurs différentes des densités de nos matériaux, nous avons choisi de travailler en terme de nombre de particules par macrophage plutôt qu'en poids de particules par ml. Ceci nous permettra de comparer la réaction cellulaire aux différents matériaux en quantités égales de particules par macrophage. La gamme de concentrations que nous avons choisie varie de 5 à 2500 particules par macrophage.

Tests de médiateurs inflammatoires

Les surnageants des cellules incubées avec les particules dans des conditions identiques à celles des tests de phagocytose et cytotoxicité furent recueillis et congelés à -70°C jusqu'aux dosages par ELISA.

3.2 LIGNÉE CELLULAIRE

3.2.1 Choix de la lignée

Nous avons choisi d'utiliser la lignée cellulaire J774 de macrophages de souris (ATCC, Rockville, MD, USA), reconnue pour sa capacité à phagocyter des particules et être de morphologie similaire à celle des macrophages retrouvés à l'interface os-implant (Horowitz *et al.*, 1995). De plus, le choix de cette lignée (Algan *et al.*, 1996; Catelas *et al.*, 1996; Horowitz *et al.*, 1994, 1995; Nakashima *et al.*, 1995) plutôt que des macrophages isolés de sang périphérique séparés sur gradient ficoll-diatrozoate (Blaine *et al.*, 1996; Chiba *et al.*, 1993, 1994; Harada *et al.*, 1994, 1995; Horikoshi *et al.*, 1994; James *et al.*, 1995; Perona *et al.*, 1992) permet d'assurer une similitude des cellules entre-elles évitant des fluctuations de résultats dues à des réponses différentes de macrophages provenant de sangs différents, ainsi qu'une sécurité de manipulation face aux risques de contamination.

Une étude préliminaire (Projet de fin d'études, Août 95) utilisant la lignée de macrophages de souris RAW a montré qu'il n'existait pas de différence significative entre les deux lignées, principalement en ce qui concernait la phagocytose. Pour ce qui est de la cytotoxicité, on a pu constater quelques légères variations. L'alumine et la zircone semblaient en effet légèrement plus toxiques chez la lignée RAW, mais ces différences restaient très faibles et négligeables. Cependant, il serait intéressant de refaire

les mêmes expériences avec une lignée d'un autre animal ou mieux encore de réaliser les tests sur des macrophages humains afin de voir si des différences apparaissent en utilisant deux espèces différentes. En effet, peu d'études ont été réalisées sur différentes populations cellulaires. A ce titre, Glant *et al.* (1994), ayant analysé la réponse de 3 populations de macrophages de souris à différents débris (Ti, PMMA), ont pu constater une différence de réponse en fonction du type de macrophages utilisés.

3.2.2 Cultures

La mise en contact avec les particules d' Al_2O_3 , de ZrO_2 , et de PE a été réalisée dans des tubes, à la concentration de 4×10^5 cellules par ml de milieu en présence des particules. Les cellules furent incubées à 37°C sous une atmosphère de 95% d'air et 5% de CO_2 .

Après différents essais de culture, nous avons choisi d'utiliser le milieu RPMI 1640 (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada), contenant 25 mM Hepes et 2 mM L-Glutamine, auquel nous avons ajouté 10% de sérum de veau foetal, 100 U/ml de pénicilline, 100 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine, et 100 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicine.

3.3 CYTOMÉTRIE EN FLUX

3.3.1 Principe du cytomètre

Par définition, le cytomètre permet de mesurer simultanément de multiples caractéristiques physiques des cellules par diffraction d'un faisceau laser. Son fonctionnement est illustré par la figure 3.1 suivante:

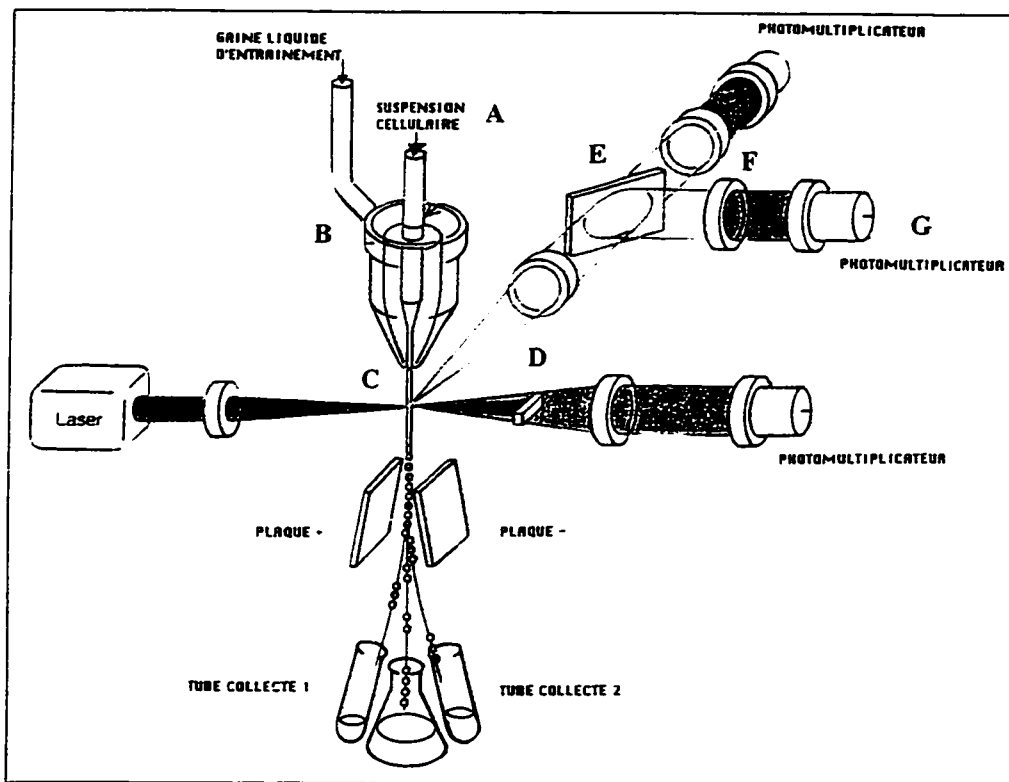


Figure 3.1: Illustration du fonctionnement du cytomètre

Les cellules sont mises en suspension (A) et soumises à une surpression (B) qui les fait progresser une par une au centre d'une veine liquide (C). Elles sont alors interceptées par

le rayon lumineux émis par le laser. Les cellules émettent alors des signaux optiques (D) guidés par des miroirs dichroïques (E) et des filtres (F) vers des photomultiplicateurs (G).

Dans notre étude, nous avons utilisé le cytomètre FASCan (Becton Dickinson), dont la longueur d'onde du faisceau laser d'argon refroidi à l'air est de 488 nm. Cet appareil permet la discrimination des cellules en mesurant 4 paramètres à la fois:

1. Taille de la cellule: Forward Scatter (FSC), donnée par les deux rayons passant tout droit la cellule (figure 3.2). La diffraction du faisceau laser est mesurée avec un angle de 2 degrés.
2. Complexité (ou granularité) de la cellule: Side Scatter (SSC), donnée par la totalité des rayons lumineux réfléchis et réfractés par la cellule (Figure 3.2) et mesurée à un angle de 90^0 (dans notre étude, la présence intra-cellulaire de particules suite à la phagocytose va entraîner une augmentation de granularité de la cellule).
3. Fluorescence verte émise par la cellule fixée par un fluorochrome émettant dans le vert (FITC): FL1.
4. Fluorescence rouge émise par la cellule fixée par un fluorochrome émettant dans le rouge (PE): FL2.

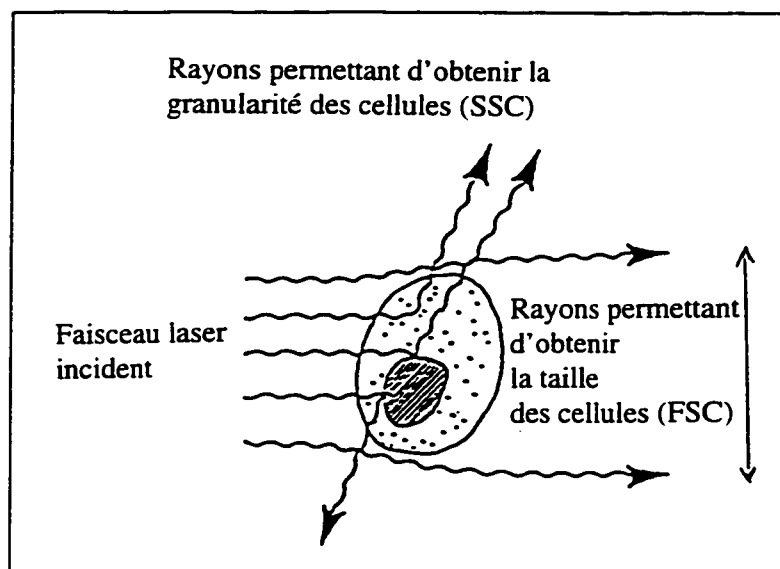


Figure 3.2: Illustration de la diffraction du faisceau laser sur une cellule

Les signaux obtenus pour notre étude sont de deux types:

* $SSC=f(FCS)$:

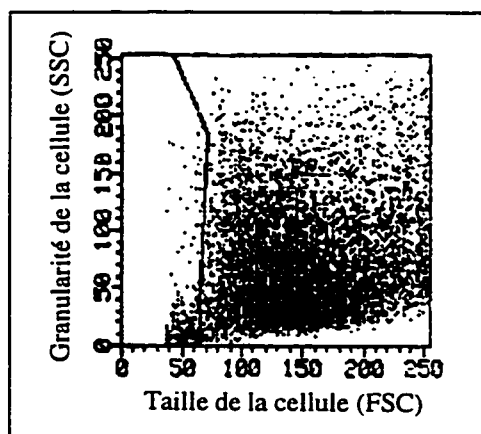


Figure 3.3: Graphique illustrant la répartition des particules ou des cellules, en fonction de leur taille (FSC) et leur granularité (SSC).

* Absorbance = f (longueur d'onde):

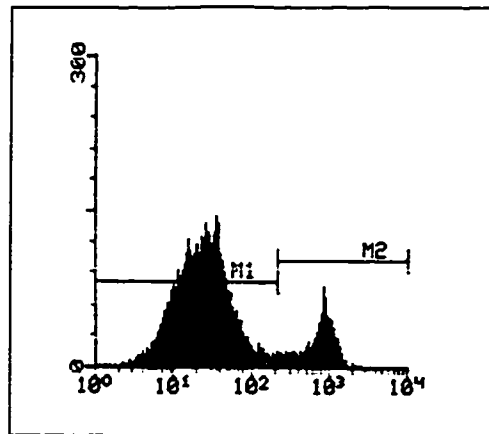


Figure 3.4: Graphique illustrant la répartition des cellules en fonction de leur longueur d'onde.

Nous avons d'abord réalisé l'expérience sur les particules des matériaux seuls, afin de voir à quelle longueur d'onde nous obtenions la fluorescence de chacun des matériaux. Nous avons ainsi pu constater qu'aucune de nos particules n'étaient fluorescentes. Nous avons ensuite réalisé l'expérience sur les cellules seules, afin de connaître la longueur d'onde de fluorescence des macrophages seuls (contrôle négatif).

L'acquisition des données se fait en "list mode", c'est à dire que l'acquisition de toutes les données se fait systématiquement et que leur traitement peut être différé ou modifié. Parallèlement à l'unité analytique (cytomètre lui-même), une unité informatique (ordinateur et imprimante) est directement reliée à l'appareil et permet le traitement des données.

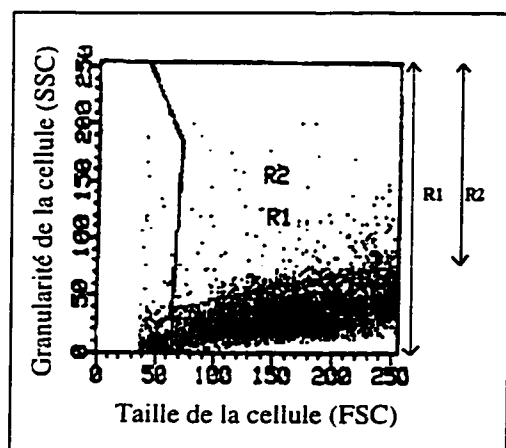
3.3.2 Tests de phagocytose:

Afin d'évaluer la phagocytose des particules par les macrophages, deux approches sont possibles: utiliser le graphe $SSC=f(FCS)$, ou le graphe $absorbance=f(\text{longueur d'onde})$.

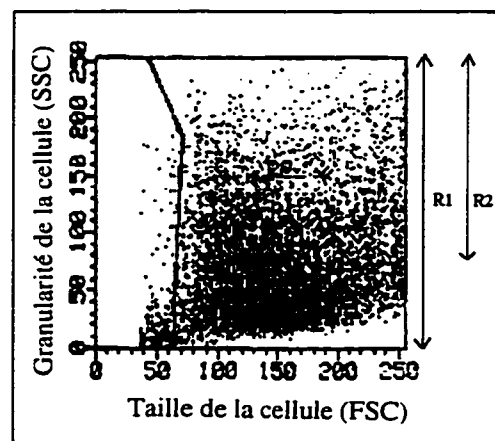
- Si l'on utilise le graphe $SSC=f(FCS)$, la différence de positionnement du signal obtenu avec les macrophages après exposition aux particules par rapport au signal obtenu avec les macrophages seuls indique un changement de granularité et/ou de taille, ce qui nous donne un indice de phagocytose.
- Si l'on utilise le graphe $absorbance=f(\text{longueur d'onde})$ et que les particules sont plus fluorescentes que les macrophages, le signal obtenu après phagocytose des particules par les macrophages sera décalé à droite par rapport au signal obtenu avec les macrophages seuls. La différence de ces deux signaux nous permettra d'en déduire le nombre de particules phagocytées par macrophage.

Remarquons que l'information donnée par le graphe $absorbance=f(\text{longueur d'onde})$ est la meilleure, puisqu'elle nous donne le nombre de particules phagocytées par macrophage. Malheureusement, comme il est impératif que les particules soient plus fluorescentes que les macrophages seuls et que nos particules n'étaient pas fluorescentes, nous avons donc dû utiliser l'information donnée par le graphe $SSC=f(FCS)$. L'utilisation du graphe $SSC=f(FCS)$ nous permet d'obtenir le pourcentage de macrophages ayant changé de taille et/ou de granularité après ingestion des particules. Nous avons appelé ce

pourcentage "**indice de phagocytose**". Il est égal au rapport du pourcentage de cellules dans la région 2 (R2) sur le pourcentage de cellules dans la région 1 (R1) (Figure 3.5). R2 et R1 sont deux fenêtres définies manuellement sur le graphe SSC=f(FSC), où R2 inclut les cellules ayant changé de granularité et/ou de taille (cellules stimulées), et R1 la somme totale des cellules analysées. Les pourcentages de cellules dans ces deux régions sont directement calculées par l'ordinateur en mode analyse. Afin d'éviter une surestimation de l'indice de phagocytose, l'indice des contrôles négatifs (cellules incubées sans particules) est toujours soustrait. Les fenêtres R1 et R2 doivent être définies de telle sorte que l'indice de phagocytose des contrôles négatifs soit inférieur à 5%. Ce chiffre représente la valeur maximale de notre erreur d'estimation ($\pm 5\%$).



Macrophages incubés seuls (contrôle)



Macrophages incubés en présence de particules d'alumine

Figure 3.5: Acquisition de données par cytométrie en flux pour les tests de phagocytose (avec R1: somme des cellules et R2: cellules qui ont changé de taille et/ou de granularité après ingestion des particules).

Dans notre étude de cinétique de phagocytose, un deuxième indice appelé "**indice de particules ingérées**", représente le pourcentage d'augmentation de granularité des macrophages stimulés, comparé aux cellules non stimulées. Cet indice est calculé en utilisant les valeurs de la médiane de SSC (axe y sur le graphe $SSC=f(FSC)$) et est calculé sur une échelle logarithmique de 4 décades en mode analyse. Il est ainsi égal au rapport de la valeur de la médiane de la granularité cellulaire après incubation avec les particules sur la valeur médiane de la granularité cellulaire des contrôles négatifs (sans particules), multiplié par 100.

Ainsi, alors que "**l'indice de phagocytose**" est une réflexion du nombre de macrophages stimulés, "**l'indice de particules ingérées**" est une réflexion du nombre de particules ingérées par macrophage stimulé.

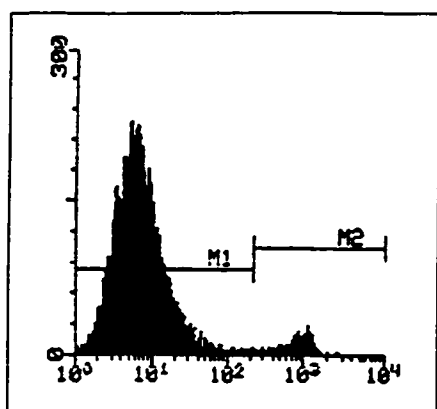
3.3.3 Tests de cytotoxicité

La cytotoxicité est la capacité qu'a un corps étranger à provoquer des altérations cellulaires lorsqu'il est implanté dans l'organisme. Sa mesure peut se faire de nombreuses manières:

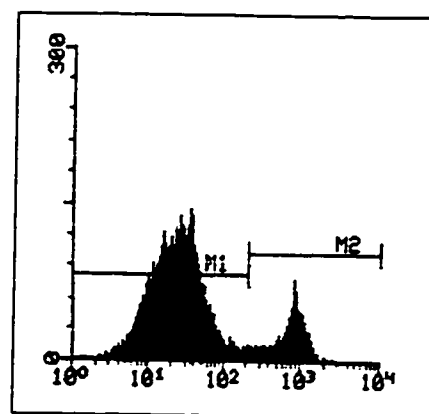
- test d'intégrité de la membrane: test de LDH,
- test de réplication de l'ADN par mesure de l'incorporation de [3H]-Thymidine,

- test de la capacité des lysosomes par la méthode d'incorporation du rouge neutre (fluorométrie),
- test de la synthèse protéique,
- test au bleu crystal: calcul de la surface de lyse,
- test HTT ("tetrazolium based colorimetric assay"): mesure du nombre de cellules vivantes par spectrophotométrie,
- test de mortalité cellulaire au Bleu Trypan ou iodure de propidium.

Afin de tester la mortalité par cytométrie en flux, nous avons utilisé un colorant rouge (iodure de propidium: PI), pénétrant dans les cellules mortes. Ce colorant vital s'intercale dans les acides nucléiques (ARN et ADN) des cellules mortes et permet ainsi d'obtenir un signal de fluorescence différent pour les cellules mortes et pour les cellules vivantes qui empêchent le colorant de pénétrer. Les pourcentages de cellules vivantes et mortes sont directement calculées par l'ordinateur en mode analyse (marqueurs M1 et M2: Figures 3.6).



Macrophages incubés seuls (contrôle)



Macrophages incubés en présence de particules d'alumine

Figure 3.6: Acquisition de données par cytométrie en flux pour les tests de cytotoxicité (avec marqueur M1: cellules vivantes et marqueur M2: cellules mortes)

3.4 MÉDIATEURS INFLAMMATOIRES

Les dosages des trois médiateurs choisis (IL-1 α , IL- β et TNF- α) s'effectuent par la méthode ELISA. Le principe de base de cette méthode repose sur l'utilisation d'un anticorps conjugué à une enzyme qui, en réagissant avec son substrat, forme un produit de réaction coloré. L'intensité de couleur est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre et est directement proportionnelle à la quantité de substance dosée. Nous avons utilisé des kits pour dosages de cytokines par la méthode sandwich non compétitive. Le principe d'une telle technique est le suivant: dans un premier temps, l'antigène de l'échantillon

testé est capturé par un anticorps fixé sur une matrice. Puis une enzyme couplée à un deuxième anticorps dirigé vers un épitope antigénique différent du premier est additionnée, complétant ainsi le sandwich. Dans notre cas, l'antigène de départ est une cytokine (IL-1 α ou β , ou TNF- α) à deux épitopes différents.

3.4.1 Dosage d'IL-1 α

Il s'agit d'un essai immunosorbant lié à une enzyme et basé sur le principe de la méthode sandwich. Tout d'abord, un anticorps (AC) monoclonal anti-IL-1 α est bloqué puis utilisé pour capturer l'IL-1 α présent dans les standards et les échantillons. Après lavage, un AC polyclonal biotinylé est ajouté pour se lier à l'IL-1 α capturé et former des complexes immuns biotinylés, suivi d'avidine peroxidase conjugué qui se fixe sur ces complexes. L'addition d'une solution substrat initie un changement de couleur catalysé de la peroxidase. La réaction est arrêtée par acidification après quelques minutes. L'absorbance est mesurée à 450 nm et est proportionnelle aux concentrations d'IL-1 α présent dans les échantillons.

La sensibilité d'un tel test est de l'ordre de 15 pg/ml et l'échelle de la courbe standard à partir de laquelle les concentrations dans les échantillons peuvent être déterminées est de l'ordre de 15 à 405 pg/ml.

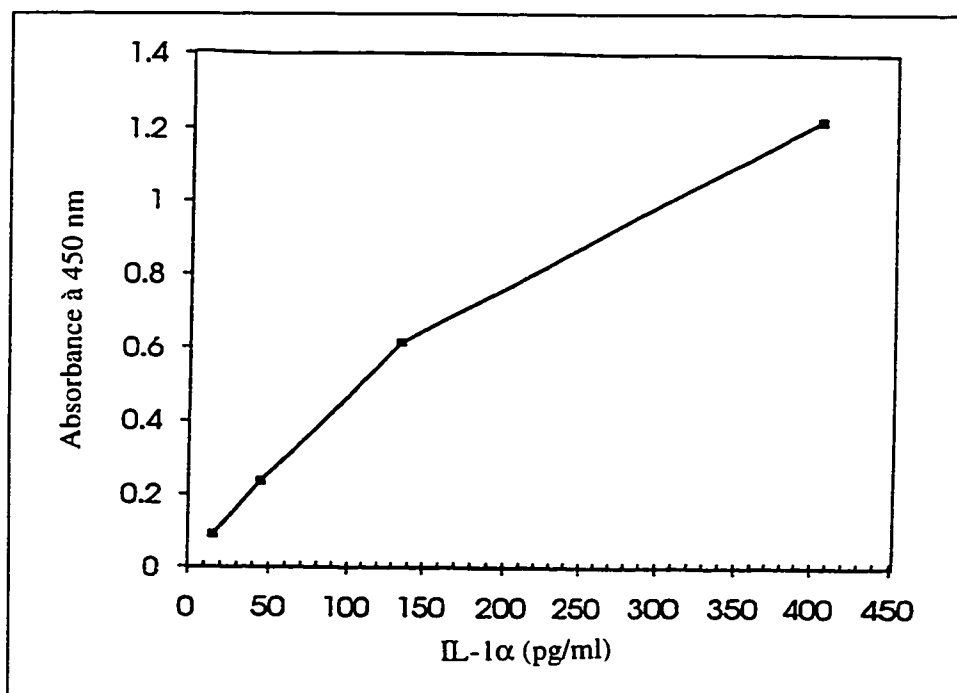


Figure 3.7: Exemple de courbe standard typique (IL-1 α)

3.4.2 Dosage d'IL-1 β

Il s'agit ici encore d'un essai immunosorbant lié à une enzyme. Tout d'abord, un anticorps anti-IL-1 β fixé à une phase solide (matrice) est utilisé pour capturer l'IL-1 β présent dans les standards et les échantillons. L'IL-1 β ainsi capturé est alors mis en incubation avec un deuxième anticorps anti-IL-1 β biotinylé. L'HRP (Horseradish peroxidase) conjuguée à de la streptavidine est alors utilisé comme réactif de détection qui sera relié au complexe immune résultant. Le changement de couleur de la peroxydase

catalysée est initié par l'addition d'une solution substrat contenant du peroxyde d'hydrogène et de la tétraméthylbenzidine (TMB). C'est l'intensité de ce changement de couleur qui indique les proportions relatives de IL-1 β présent dans les échantillons. Une courbe standard préparée à partir de IL-1 β en concentrations connues est utilisée pour quantifier nos résultats à une longueur d'onde de 450 nm.

La sensibilité d'un tel test est de l'ordre de 10 pg/ml et la précision de ce test est telle que la mesure de IL-1 β n'interfère pas avec les autres cytokines. L'échelle de la courbe standard est de l'ordre de 15 à 960 pg/ml.

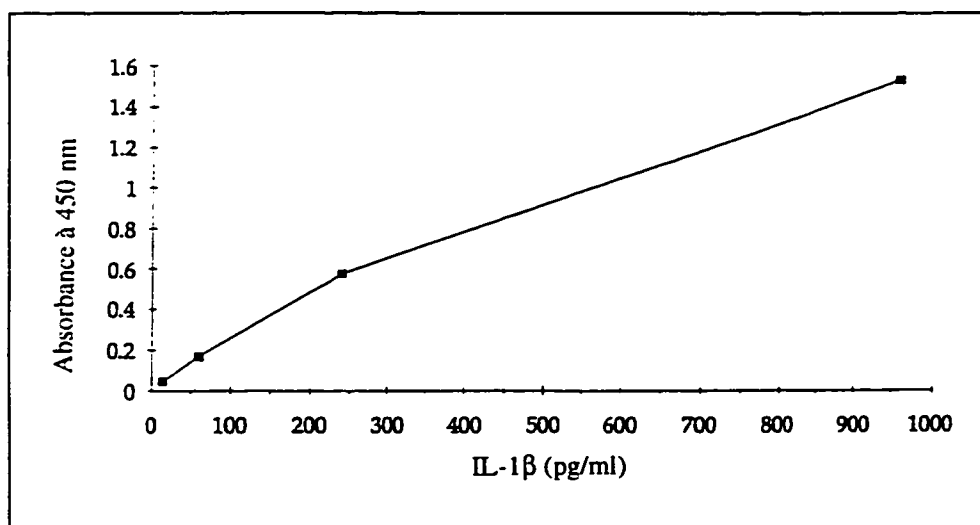


Figure 3.8: Exemple de courbe standard typique (IL-1 β)

3.4.3 Dosage de TNF- α

De même que pour IL-1 α et β , les échantillons et les standards sont d'abord incubés avec un anticorps monoclonal fixé sur une phase solide (matrice), qui capture le TNF- α présent. L'ensemble est ensuite incubé avec un deuxième anticorps conjugué à l'HRP conjugué à ce deuxième anticorps. On obtient le complexe suivant:

$$\text{matrice, anti-TNF-}\alpha : \text{TNF-}\alpha : \text{HRP-anti-TNF-}\alpha.$$

Ce complexe est alors mis en incubation avec le substrat (peroxyde) et le chromagène (TMB). Le développement du changement de couleur résultant est directement proportionnel au taux de TNF- α présent dans les échantillons. Les valeurs des absorbances sont lues à 450 nm en utilisant un lecteur ELISA, comme pour le dosage de l'IL-1 α et β .

La sensibilité du test utilisé est de l'ordre de 15 pg/ml et sa précision permet de ne pas avoir d'interférence avec les autres cytokines. L'échelle de la courbe standard est de l'ordre de 35 à 2240 pg/ml.

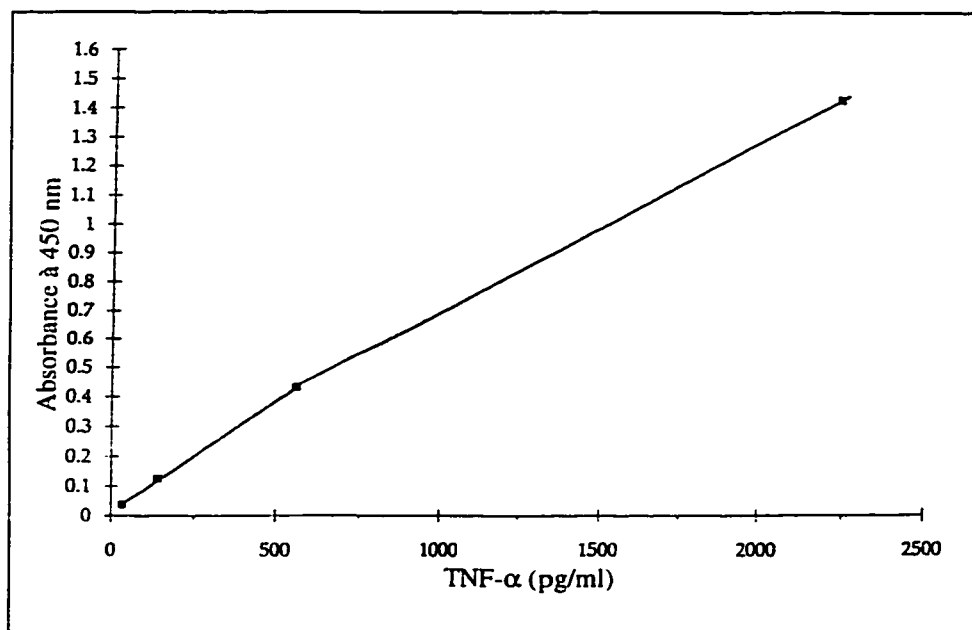


Figure 3.9: *Exemple de courbe standard typique (TNF- α)*

3.5 TYPE DE MORTALITÉ

3.5.1 Analyse de la morphologie cellulaire

Comme nous l'avons vu lors du chapitre 1, la présence d'apoptose peut être caractérisée par la morphologie des cellules qui se condensent lorsqu'elles entrent en apoptose.

Afin d'observer la morphologie des cellules, nous les avons fixées à l'iodure de propidium (fluorochrome rouge) et échantillonnées sur plaques en vue de les observer au

microscope à fluorescence (Aristoplan, Leitz Wetzlar, Allemagne). Les photos furent réalisées à l'aide de films Kodak Ektachrome 400 ASA.

3.5.2 Analyse de la fragmentation de l'ADN (DNA laddering)

Comme nous l'avons vu lors du chapitre 1, l'apoptose est également associée à l'activation de nucléases qui dégradent l'ADN en larges fragments puis en très petits fragments oligonucléosomaux.

Le principe de l'analyse de la fragmentation de l'ADN sur gel d'agarose est de visualiser qualitativement cette fragmentation par bandes correspondant à des fragments d'ADN de un ou plusieurs oligonucléosomes. L'intensité du ladder observé est proportionnel au taux de fragmentation de l'ADN des cellules, donc au taux d'apoptose dans l'échantillon analysé (la préparation de ces échantillons est présentée dans l'article 2, chapitre 4). L'ADN étant chargé négativement de façon uniforme, l'utilisation d'agarose permet de séparer cette molécule uniquement en fonction de la grandeur de ses brins. Dans un champ électrique, l'ADN de faible dimension étant moins retenu par le gel migrera plus rapidement que l'ADN de grande dimension. Afin de visualiser les bandes, 5 à 10 μ g d'ADN sont déposés dans les puits du gel, et placé sous un champ électrique de 50 volts. Les fragments d'ADN sont visualisés avec du bromure d'éthidium qui s'intercale entre les bases d'ADN et peut être visualisé sous lumière ultraviolette.

CHAPITRE 4: Étude de la réponse *in vitro* des macrophages à des particules de céramiques et de polyéthylène (Article 1)

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, la réponse cellulaire à des débris d'usure peut se diviser en plusieurs étapes, depuis la reconnaissance des substances étrangères et leur phagocytose par les macrophages, jusqu'à la mort cellulaire et/ou la sécrétion de médiateurs inflammatoires influençant la résorption osseuse.

L'utilisation de la cytométrie en flux nous a permis d'analyser quelques unes de ces étapes, à savoir la phagocytose et la cytotoxicité en terme de mortalité cellulaire (pourcentage de cellules mortes). Cette méthode nous a aussi permis d'analyser l'importance de la taille, la concentration et la composition des particules. Nos résultats sont présentés dans l'article 1, intitulé "**Macrophage response to ceramic and polyethylene particles: Effects of size, concentration and composition**" et soumis au "Journal of Biomedical Materials Research". Afin de compléter les résultats concernant la comparaison de cytotoxicité de l'alumine et le polyéthylène à 4.5 μm , nous y avons également présenté quelques résultats de dosages de médiateurs inflammatoires obtenus par tests ELISA. La cytométrie en flux s'est en effet avéré être un excellent modèle qui pourrait être généralisable à l'étude de n'importe quel biomatériau à l'état particulaire,

pour des tailles inférieures à 2.5 μm , mais connaît cependant des limites pour des particules de taille supérieure, comme c'était le cas pour la comparaison de l'alumine et du polyéthylène (4.5 μm).

ARTICLE 1

MACROPHAGE RESPONSE TO CERAMIC AND POLYETHYLENE PARTICLES: EFFECTS OF SIZE, CONCENTRATION AND COMPOSITION

Isabelle Catelas, *Olga L. Huk, Alain Petit, Richard Marchand, and L'Hocine Yahia

Isabelle Catelas, Institute of Biomedical Engineering

L'Hocine Yahia, Department of Mechanical Engineering

École Polytechnique de Montréal, Biomechanics/Biomaterials Research Group,

P.O. Box 6079, Succ. "Centre-Ville", Montréal, Québec, H3C-3A7, Canada.

Alain Petit, Orthopaedic Research Unit, Lady Davis Institute for Medical Research

*Olga L. Huk, Division of Orthopaedic Surgery, McGill University

Sir Mortimer B. Davis - Jewish General Hospital

3755 Ch. Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec, H3T-1C5, Canada

Phone: (514) 340-8222, Ext: 3605, Fax: (514) 340-7502

Richard Marchand

Institut de Cardiologie, 5000 Est Rue Bélanger, Montréal, Québec, H1T-1C8, Canada.

*To whom correspondence should be addressed

4.1 SYNOPSIS

Using the J774 macrophage cell line, we designed an *in vitro* model to analyze the effects of size, concentration and composition of ceramic particles (Al_2O_3 and ZrO_2) and high density polyethylene (HDP) on phagocytosis and cell mortality by flow cytometry. Inflammatory mediator ($\text{TNF-}\alpha$) was also measured by ELISA. Kinetic studies revealed that phagocytosis of the particles begins very early after cell exposure, increasing with time and particle concentration, and reaching a plateau after 15 hours. This implies that the optimum period to evaluate cellular response to particulate debris should be between 15 and 24 hours of incubation. Results also showed that phagocytosis increases with concentration for particles up to 2 μm . For larger particles (up to 4.5 μm), phagocytosis seems to reach a plateau, independent of size and concentration, which suggests a saturation of phagocytosis, most likely dependent on overall particle volume ingested. With regards to composition, we did not detect any significant difference in phagocytosis between Al_2O_3 and ZrO_2 at 0.6 μm . Al_2O_3 seems to be more easily phagocytosed than HDP at the same size (4.5 μm) and concentrations. Cytotoxicity studies revealed that macrophage mortality increases with particle size and concentration for size greater than 2 μm . Smaller particles (0.6 μm) cause cell mortality only at higher concentrations (as of 1250 particles per cell), but the mortality is still very low (< 10%). No significant difference in cell mortality and $\text{TNF-}\alpha$ release was found between Al_2O_3 and ZrO_2 . Effects of Al_2O_3 and HDP at 4.5 μm were compared by measuring $\text{TNF-}\alpha$ release.

Results showed that TNF- α release increases with particle concentrations and is higher with HDP than with Al₂O₃.

Keywords : Total hip arthroplasty, ceramic and polyethylene particles, macrophage response, flow cytometry.

4.2 INTRODUCTION

Aseptic loosening, initiated by wear particles, is without a doubt the main cause of THA failure.^{1,2} It is a well-accepted fact that wear debris, be it cement, metal or polyethylene, can induce a foreign body inflammatory reaction leading to periprosthetic osteolysis.^{3,4,5} In addition to their excellent wear characteristics, ceramics were thought to be more bioinert than polyethylene, and for these reasons, the ceramic-ceramic (CC) joint couple has been used for THA in Europe since 1972.⁶ The wear rate of CC joint couple in THAs was theoretically calculated to be 0.025 $\mu\text{m}/\text{year}$, compared to 100 $\mu\text{m}/\text{year}$ for the classic Charnley metal-polyethylene (MPe) joint couple.⁷ More recently, yttrium-stabilized zirconia ceramics have been projected as the future material of choice for orthopedic application due to superior mechanical material properties.⁸ However, work in our laboratory on pseudomembranes retrieved at revision surgery has shown that even ceramic particles can induce a macrophage foreign body response.^{9,10}

While analysis of pseudomembranes retrieved at revision surgery has provided much information on the particle sizes generated *in vivo*⁹⁻¹² and has identified a myriad of inflammatory mediators that are released by macrophages,¹³⁻²¹ very little is understood about the exact parameters to which the macrophage responds and about the kinetics of this response. Indeed, many confounding factors are inherent to *in vivo* studies and it is difficult to determine the relative importance of each parameter, such as size, concentration and composition of the particles on ultimate macrophage response.

Numerous *in vitro* studies have evaluated macrophage mediator release to various forms of particulate debris including both commercially obtained particles and particles isolated from periprosthetic tissue harvested at time of surgery.^{18,22,23} However, despite many studies analyzing cellular response to HDP particles,^{24,25} little is known about the stimulatory effects of particulate ceramics on macrophages. Nakashima *et al.* reported the ability of alumina ceramic particles to induce the release of bone resorbing mediators (IL-6, TNF- α and IL1- α) by macrophages in a dose dependent manner.²³ But the particles used for macrophage stimulation by Nakashima *et al.* were unusually large (1, 100 and 1000 μm) and do not reflect the submicronic ceramic debris generated *in vivo*.⁹

Moreover, much of the cell culture work has focused on evaluation of mediator release into culture medium using ELISA techniques but little attention has been given to evaluation of the actual stimulated macrophage on a cell by cell basis. Flow cytometry is one such powerful tool which enables a quantitative simultaneous evaluation of multiple

cellular parameters as each cell passes through the cytometer laser beam. Using this method, we developed a new *in vitro* model for testing cellular response and the standardization of flow cytometry for this type of *in vitro* model should be applicable to the study of cellular response to any kind of biomaterial particles.

Therefore, the purpose of this study was to use flow cytometry to evaluate macrophage response (phagocytosis and cell mortality) in an *in vitro* environment when controlling for *size*, *concentration* and *composition* of different ceramics and high density polyethylene particles (Al_2O_3 , ZrO_2 and HDP, respectively). Combining our flow cytometry results with the measures of inflammatory mediator release by ELISA tests, we will be able to compare metal MPe and CC joint couples used in THAs in terms of inflammatory reaction. To the best of our knowledge, the *in vitro* macrophage response to zirconia particles has never been analyzed and cellular response to ceramic and polyethylene particles has never been compared.

4.3 MATERIALS AND METHODS

4.3.1 Particles

Al_2O_3 (Alcan (Jonquières, Québec, Canada), Alcoa (Bauxite, AK, USA), Durmax (Chatellerault, France)), ZrO_2 partially stabilized with yttrium (Unitec Ceramics (Stafford, England)) and HDP particles (Shamrock Technologies (Newark, NJ, USA))

were commercially obtained in the phagocytosable range: 0.6 (Alcan), 1.3 (Alcoa), 2.4 (Alcan) and 4.5 μm (Durmax) for Al_2O_3 , 0.6 μm for ZrO_2 (Unitec Ceramics) and 4.5 μm for HDP (Shamrock Technologies). Particles were sterilized by ethylene oxide.

4.3.2 Cell culture

The J774 murine macrophage cell line (ATCC (Rockville, MD, USA)) was used in this *in vitro* model. Macrophages were cultured and maintained in RPMI 1640 tissue culture medium (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin. For flow cytometry tests, cells were exposed to particles in tubes, containing 4×10^5 cells in 1 ml of culture media with a particle suspension at concentrations varying from 5 to 1250 particles per macrophage. Culture tubes without particles served as negative controls. Incubations were conducted at 37°C in a 5% CO_2 environment and for 24 hours. Supernatants were collected for ELISA tests and frozen at -70°C . The tubes were then washed with PBS (pH 7.2) and cells were stained with propidium iodide (PI) for 4 minutes, at room temperature. Tubes were again washed and data were collected using flow cytometry.

4.3.3 Flow cytometry analysis

Flow cytometry allows the measurement of physical of cells, based on the principle of laser beam diffusion. As each cell passes through the laser beam, a flash of scattered and/or fluorescent light is emitted, depending on cell characteristics. Upon reaching different photodetectors, the emitted light is converted into an electrical signal, giving information on cell size (forward scatter or FSC), granularity (side scatter or SSC) and/or fluorescence (Fl-1, Fl-2 or Fl-3).

We evaluated the effects of particle *size*, *concentration* and *composition* on the phagocytosis and mortality of macrophages. Cellular response to Al_2O_3 and ZrO_2 was compared at 0.6 μm and cellular response to Al_2O_3 and HDP was compared at 4.5 μm . Kinetic studies allowed us to evaluate, when controlling for size, the progression of phagocytosis with time and concentration of particles, in order to determine when cell stimulation is maximal. Kinetic tests (5 min to 24 hours) were conducted on Al_2O_3 at 1.3 μm .

An air-cooled 488 nanometer lengthwave laser flow cytometer (FACScan, Becton Dickinson (Palo Alto, CA, USA)) was used for data collection. A minimum of 2000 cells were evaluated per test, in list mode. Flow cytometric analysis of phagocytosis determines the percentage of macrophages that have phagocytosed the particles by detecting changes in cell granularity (measured by SSC) and/or changes in cell size

(measured by FSC) following particle ingestion. A **phagocytosis index** was used to represent the later percentage, which is equal to the ratio of the percentage of cells in region 2 (R2) to the percentage of cells in region 1 (R1) (Figures 4.1A and 4.1B). R2 and R1 are two manually defined windows on a $SSC=f(FSC)$ graph, where R2 includes cells that have changed in granularity and/or size (stimulated cells), and R1 the sum of all cells analyzed. Cell percentages in these two regions are calculated by the computer in analysis mode. To avoid an overestimation of the phagocytosis index, the index for negative controls (cells incubated without particles) is always subtracted.

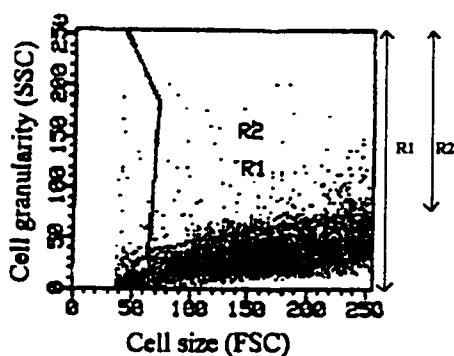


Figure 4.1A

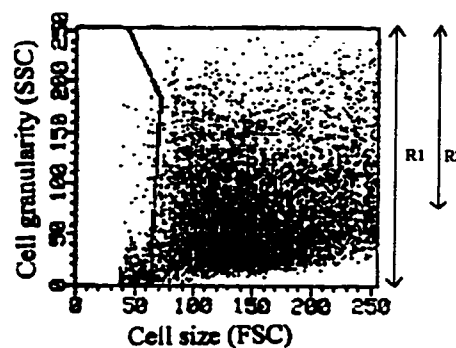


Figure 4.1B

Figure 4.1. Flow cytometric data acquisition of phagocytosis tests. J774 macrophages were incubated 24 hours without particles (control - Figure 4.1A) and with Al_2O_3 at the concentration of 250 particles per cell and at $0.6\ \mu m$ (Figure 4.1B). R1 and R2 are manually defined windows, where R1 represents the sum of the cells and R2 the cells that have changed in granularity and/or size after particle ingestion (stimulated cells).

In our kinetic studies, a second index, called the **particle ingestion index**, represents the percentage of increase in granularity of each stimulated macrophage as it ingests more and more particles, compared to non stimulated cells. This index is determined using the median of SSC (y axis of the SSC = f(FSC) graph), and calculated on a 4 decade log scale in analysis mode. This index is also equal to the ratio of the median of cell granularity after incubation with particles to the median of cell granularity after incubation without particles.

Whereas the **phagocytosis index** is an indicator of the number of stimulated macrophages, the **particle ingestion index** is an indicator of the number of particles ingested per stimulated macrophage.

The cytotoxic effect of particle stimulation on macrophages, evaluated as **cell mortality**, is obtained by measuring the percentage of fluorescent dead macrophages stained with PI. Markers 1 and 2 (M1 and M2) define the range of live and dead cells respectively (Figures 4.2A and 4.2B), and cell percentages are calculated by the computer in analysis mode.

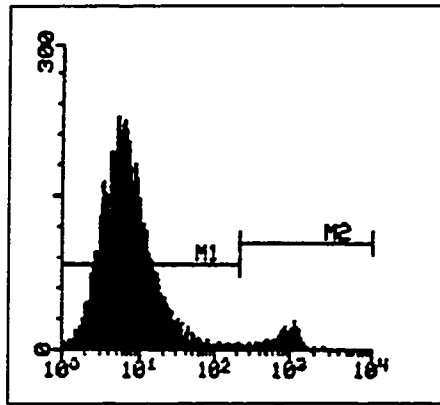


Figure 4.2A

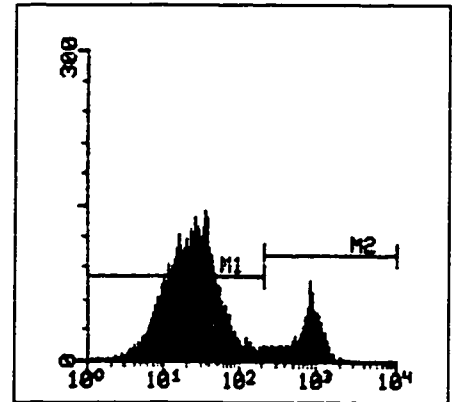


Figure 4.2B

Figure 4.2. Flow cytometric data acquisition of cytotoxicity tests. J774 macrophages were incubated 24 hours without particles (control - Figure 4.2A), and with Al_2O_3 at the concentration of 250 particles per cell and at $2.4 \mu\text{m}$ (Figure 4.2B). Markers 1 and 2 (M1 and M2) define the range of live and dead cells respectively.

4.3.4 Inflammatory mediator tests

Supernatants of cells incubated with particles were collected and stored at -70°C . Concentrations of $\text{TNF-}\alpha$ was measured using a sandwich ELISA test (Genzyme (Cambridge, MA, USA)).

4.3.5 Statistical analysis

Statistical significance was calculated with the use of a paired student-t test ($p < 0.05$). Each phagocytosis and cytotoxicity test was the mean of 4 experiments performed in duplicate. Inflammatory mediator tests were the mean of 3 experiments also performed in duplicate.

4.4 RESULTS

4.4.1 Phagocytosis

Figure 4.3 presents the kinetics of Al_2O_3 phagocytosis when controlling for size at 1.3 μm . Phagocytosis of the particles begins very early after exposure to the cells. Within 2 hours of incubation, there is a direct correlation between phagocytosis index and particle concentration, with the maximum percentage of macrophage phagocytosis occurring at 15 hours. After 15 hours of incubation, there is a plateau in macrophage response to particle stimulation. There is an initial artefactual spike followed by a decrease in phagocytosis index from 0 to 2 hours which likely represents the adherence phenomenon of particles onto the macrophage membrane before particle internalization begins (figure 4.3A). The same tendencies as seen with the phagocytosis index are shown by the particle ingestion index, reflecting an increase with time of the amount of particles ingested per macrophage (figure 4.3B). The later is particularly evident at high

concentrations. The maximum number of ingested particles is reached at 15 hours of incubation, and demonstrates a saturation of phagocytosis, most likely dependent on particle volume ingested. An incubation time of 24 hours was then used for the rest of the study.

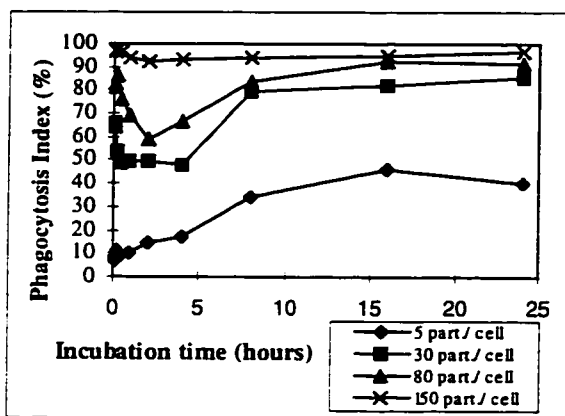


Figure 4.3A

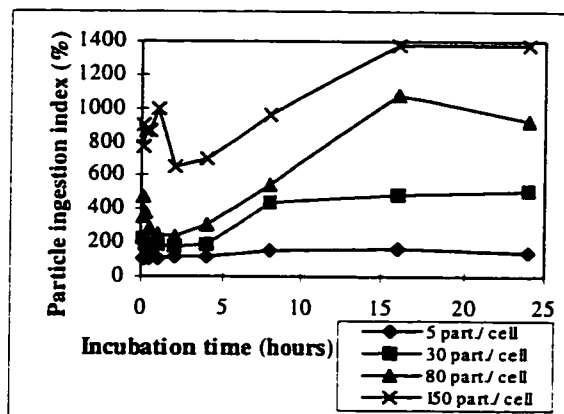


Figure 4.3B

Figure 4.3. Kinetics of phagocytosis. J774 macrophages were incubated 24 hours with increasing concentrations of Al_2O_3 at $1.3 \mu\text{m}$ for varying periods of time. Phagocytosis index (Figure 4.3A) and particle ingestion index (Figure 4.3B) were measured as described in MATERIALS AND METHODS. Results are the mean of 2 experiments performed in duplicate.

Figure 4.4 presents the effect of Al_2O_3 particle *size* and *concentration* on phagocytosis index. In the small particle range ($< 2 \mu\text{m}$), the phagocytosis index increases with particle size and concentration. In the larger particle range, the index reaches a maximum, independent of concentration. As particle concentration increases, the

percentage of stimulated macrophages increases. For particles larger than 2 μm , more than 80 % of macrophages are stimulated, independent of concentration.

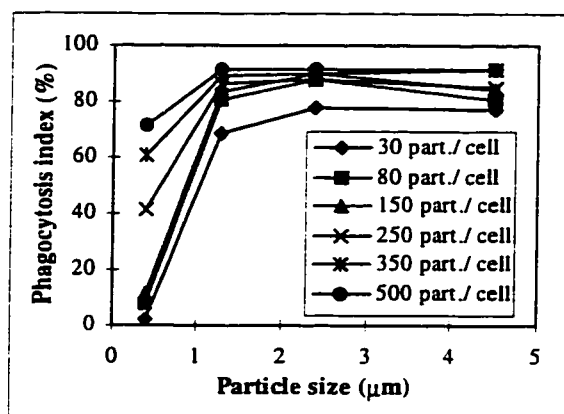


Figure 4.4. Effects of particle size and concentration on phagocytosis index. J774

macrophages were incubated 24 hours in presence of increasing sizes and concentrations of Al_2O_3 particles. Results are the mean of 5 experiments performed in duplicate.

Figure 4.5 presents the effect of ceramic particle *composition* (Al_2O_3 vs ZrO_2 and Al_2O_3 vs HDP) on phagocytosis index. There is a direct relation between phagocytosis index and concentration, and no significant difference was found between Al_2O_3 and ZrO_2 at the size we analyzed (0.6 μm) (figure 4.5A). When comparing Al_2O_3 and HDP at 4.5 μm , there is again a direct correlation between phagocytosis index and concentration, and Al_2O_3 seems to be more easily phagocytosed than HDP (Figure 4.5B).

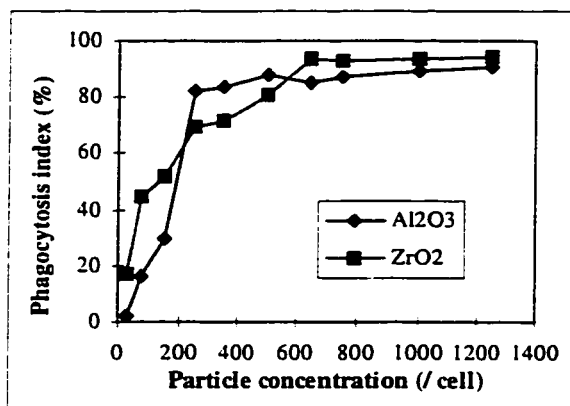


Figure 4.5A

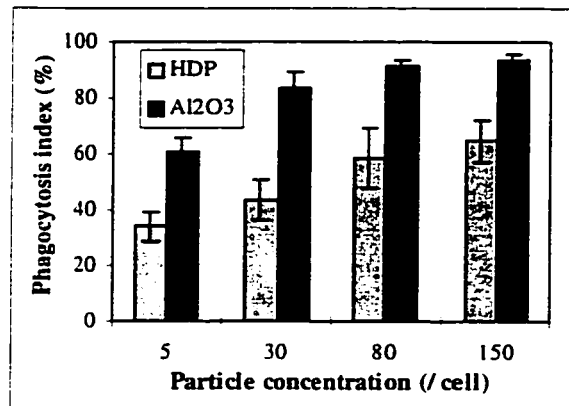


Figure 4.5B

Figure 4.5. Effects of particle composition on phagocytosis index. J774 macrophages were incubated 24 hours in presence of increasing concentrations of Al₂O₃ and ZrO₂ particles at 0.6 μm (Figure 4.5A) or Al₂O₃ and HDP particles at 4.5 μm (Figure 4.5B). Results are the mean of 5 experiments performed in duplicate.

4.4.2 Cytotoxicity

The effects of Al₂O₃ particle *size* and *concentration* on mortality are illustrated in Figure 4.6. Results show that macrophage mortality increases with particle *size* and *concentration*, and the later is only significant for particle size greater than 2 μm for concentrations up to 500 particles per macrophage. Smaller particles (0.6 μm) cause significant mortality only at higher concentrations (as of 1250 particles per cell), and the mortality is still very low (< 10%). With respect to composition, there was no significant difference in mortality between Al₂O₃ and ZrO₂ at the size (0.6 μm) and concentrations we analyzed.

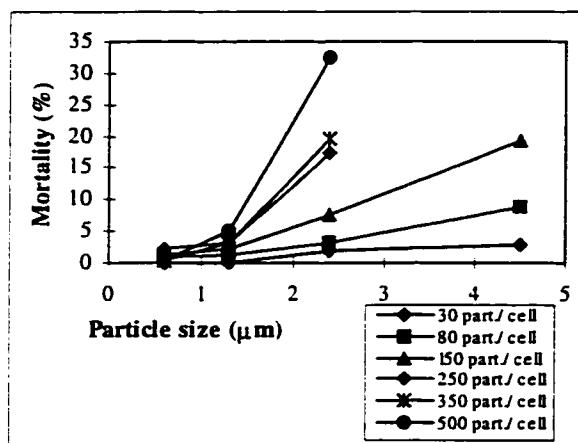


Figure 4.6. Effects of particle size and concentration on cell mortality. J774 macrophages were incubated 24 hours in presence of increasing sizes and concentrations of Al₂O₃ particles.

Results are the mean of 5 experiments realized in duplicate.

4.4.3 Inflammatory mediators

Figure 4.7 shows the effect of particles on TNF- α release from cultured J774 macrophages. Figure 4.7A shows TNF- α release from macrophages incubated with Al₂O₃ or ZrO₂ at 0.6 μ m while Figure 4.7B shows TNF- α release from macrophages incubated with Al₂O₃ or HDP at 4.5 μ m. No significant difference in TNF- α release was observed between Al₂O₃ and ZrO₂ at the size and concentrations we analyzed. However, TNF- α release was significantly higher from macrophages incubated with HDP particles than from macrophages incubated with Al₂O₃ particles, and increased with particle

concentration (2.6 times control versus 1.3 times control at 30 particles per macrophage, and 2.7 times control versus 1.4 times control at 80 particles per macrophage).

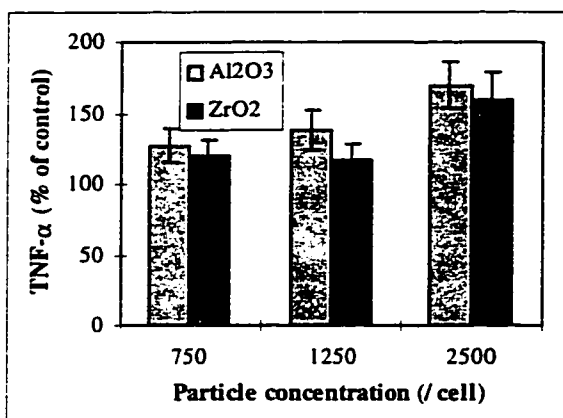


Figure 4.7A

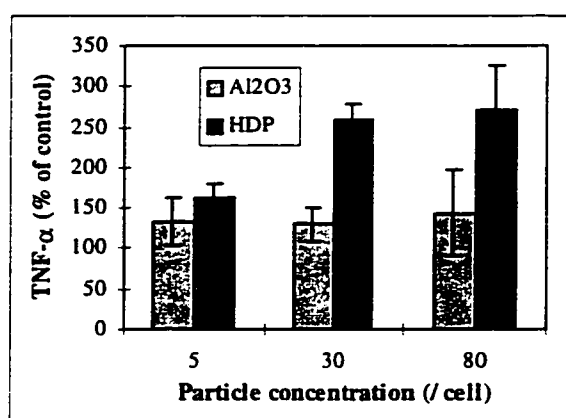


Figure 4.7B

Figure 4.7. Stimulation of TNF- α release by ceramic and HDP particles. J774 macrophages were incubated 24 hours at 3 different concentrations of Al₂O₃ and ZrO₂ particles at 0.6 μ m (Figure 4.7A), or Al₂O₃ and HDP particles at 4.5 μ m (Figure 4.7B). Results are the mean of 3 experiments performed in duplicate.

4.5 DISCUSSION

The evaluation of the macrophage inflammatory response in relation to specific particulate debris parameters has not been thoroughly studied at the cellular level. Microscopic evaluation by Murray *et al.* provided qualitative information concerning macrophage phagocytosis of latex and zymosan but the authors did not comment on how

many cells were studied nor did they quantify the morphologic changes observed.²⁶ Our results demonstrate that flow cytometry can be particularly adapted for studying macrophage response to particulate debris. Flow cytometry has the following major advantages for *in vitro* biocompatibility testing: (1) analysis is conducted at the single cell level; (2) large numbers of cells are analyzed at an extremely rapid rate; (3) all measurements are quantitative and objective; and (4) multiple cell parameters can be evaluated simultaneously. The later capacity to measure multiple parameters has allowed us to trace the macrophage inflammatory response to ceramic and polyethylene debris from initial particle recognition and phagocytosis to final cell death and/or inflammatory mediator release. The major technical limitation for the use of flow cytometry is in the large particle size range (higher than 2.5 μm) since agglomerated particles approaching the size of a cell can be mistaken as a cell by the flow cytometer (the agglomeration of 4 particles at 4.5 μm has the same size as a single macrophage). However, over 90% of wear debris generated *in vivo* is submicronic,⁹⁻¹² and it is this parameter range that is ideal for evaluation of cellular response by flow cytometry.

Our kinetic studies revealed that the phagocytic response to so-called inert ceramic particles is initiated very rapidly, within two hours. The rapidity with which particle phagocytosis occurs suggests an active process of phagocytosis similar to receptor-mediated bacterial phagocytosis.²⁷⁻²⁹ We believe that the initial decrease in phagocytosis index observed in the first two hours of incubation (Figure 4.3A) is probably a phase of

particle adherence to the cell membrane that precedes particle internalization. Phagocytosis index and particle ingestion continue to increase with time until 15 hours of incubation and then both indices reach a plateau (Figures 4.3A and 4.3B). The saturation of both the phagocytosis index and particle ingestion index within 15 hours of incubation suggests that the macrophage must attain a “maximum phagocytosable volume” beyond which it is no longer able to ingest particles. The results of our kinetic studies also imply that the optimum period to evaluate any parameter in cellular response to particulate debris should be between 15 and 24 hours of incubation.

In this study, we have demonstrated that particle size and concentration are two important parameters influencing macrophage response. In the small particle range ($< 2 \mu\text{m}$), phagocytosis index for Al_2O_3 particles increased with both size and concentration (Figure 4.4). For ceramic particles larger than $2 \mu\text{m}$, phagocytosis index quickly reached a maximal value where over 80% of macrophages were stimulated even at concentrations as low as 30 particles per macrophage. In other words, for the same concentration, larger particles have a higher chance of being seen by the cell and phagocytosed and this explains why the percentage of stimulated macrophages increases. With regards to composition, we did not find any difference between Al_2O_3 and ZrO_2 (Figure 4.5A). When comparing Al_2O_3 and HDP particles at $4.5 \mu\text{m}$, phagocytosis index is higher for Al_2O_3 than for HDP (Figure 4.5B). This difference reflects the difficulty we and other groups have had in optimizing HDP particle availability to the macrophages in

an *in vitro* environment, a technicality that is obviously not a problem *in vivo*.³⁰ Polyethylene particles have a propensity to float in culture medium and adhere to the walls of culture tubes. To solve this problem of bioavailability, we placed our culture tubes on a rotator during incubation to facilitate constant contact between cells and HDP particles. While the rotator substantially increased the phagocytosis of HDP particles, it probably did not increase the availability of HDP particles to the same degree as is observed *in vivo*.

Our cytotoxicity studies revealed that in the particle range greater than 2 μm , as size and concentration increased, cell mortality also increased (Figure 4.6). For small particles (Al_2O_3 and ZrO_2 at 0.6 μm) despite a phagocytosis index as high as 80%, negligible cell mortality (< 10%) occurred only at very high concentrations (as of 1250 particles per cell). These findings once again suggest that the two parameters that the cell responds to is a combination of size and concentration, and that this most likely translates into a "phagocytosable volume". In other words, to obtain any given percentage of cell death, we need a much higher concentration of small particles compared to larger particles.

In this study, inflammatory mediator release was analyzed in order to compare the cellular effect of Al_2O_3 vs ZrO_2 and Al_2O_3 vs HDP particles. Our results demonstrated that for any given combination of particle size and concentration, phagocytosis and cell mortality correlated directly with $\text{TNF-}\alpha$ release. There was no significant difference in

TNF- α release between Al₂O₃ and ZrO₂ at 0.6 μ m (Figure 4.7A). However, TNF- α release was significantly higher with HDP particles compared to Al₂O₃ at 4.5 μ m, and increased with particle concentration (Figure 4.7B). Our results are in agreement with those in the literature which demonstrate a direct effect of particle concentration and composition on TNF- α release.³¹ The difference in cellular response that we observed to two particles of similar size but of different composition implies that in addition to its capacity to perceive and respond to size and concentration, the cell must have a detection mechanism that is sensitive to composition or some aspect thereof. We hypothesize that for equal overall particle size, the more rounded and smoother topology of ceramic particles induces a less toxic effect on the macrophage than the sharper more angular topology of HDP particles.

4.6 CONCLUSION

The results of this study demonstrate that flow cytometry is a quantitative and objective technique to evaluate the inflammatory response to particulate debris. More specifically, we have shown that macrophage response depends on size and concentration. The response of the macrophage to a combination of particle size and concentration suggests the perception by the cell of an overall "volume" of phagocytosed particles. Our results strongly support the concept that macrophages do not perceive absolute particle numbers, but rather, respond to an overall particle volume. With regards to composition,

we did not demonstrate any difference between Al_2O_3 and ZrO_2 , which implies that in terms of inflammatory reaction, Al_2O_3 and ZrO_2 can be used indifferently as an articulating surface in THAs. However, comparing cellular response between Al_2O_3 and HDP particles at $4.5\text{ }\mu\text{m}$, we demonstrated that despite the fact that phagocytosis index is higher with Al_2O_3 , TNF- α release with HDP particles was significantly higher than with Al_2O_3 , and increased with particle concentration. This suggests a combination of the effects of particle volume and composition on final macrophage response.

Future prosthetic design efforts should focus on wear resistant interfaces to reduce debris but also on materials inducing a less intense cytokine release, which is known to be directly related to bone resorption.^{16,18,32} While not truly bioinert at the particulate level, the superiority of the CC articulating interface in terms of wear resistance and its stimulation of less macrophage TNF- α release compared to HDP, justifies continued evaluation of this material for THAs.

This study was supported by the Canadian Orthopaedic Foundation, the NSERC (National Sciences and Engineering Research Council of Canada) and the Government of Canada Awards (Department of Foreign Affairs and International Trade).

4.7 REFERENCES

1. A.J.C. Lee, and R.S.M. Ling, "Loosening", *Complication of THR*, Ling RSM, 110-123 (1984).
2. M. Spector, S. Shortkroff, H.P. Hsu, N. Lane, C.B. Sledge, and T.S. Thornhill, "Tissue changes around loose prostheses", *Clin. Orthop. Rel. Res.*, **261**, 140 (1991).
3. S.R. Goldring, M. Jasty, M.S. Roelke, C.M. Rourke, F.R. Bringhurst, and W.H. Harris, "Formation of a synovial-like membrane at the bone-cement interface: its role in bone resorption and implant loosening after total hip replacement", *Arthritis Rheum.*, **29**, 836-842, (1986).
4. O.L. Huk, M. Bansal, F. Betts, C.M. Rimnac, and E.A. Salvati, "Generation of polyethylene and metal debris from non articulating surfaces of modular acetabular components in total hip arthroplasty", *J. Bone Joint Surg.*, **76-B**, 568-574, (1994).
5. M.H. Huo, E.A. Salvati, J.R. Lieberman, F. Betts, and M. Bansal, "Metallic debris in femoral endosteolysis in failed cemented total hip arthroplasties", *Clin. Orthop.*, **276**, 157-168, (1992).
6. P. Boutin, "Arthroplastie totale de la hanche par prothèse en alumine frittée", *Rev. Chir. Orthop.*, **58**, 229-246, (1972).
7. J.M. Dorlot, P. Christel, and A. Meunier, "Wear analysis of retrieved alumina heads and sockets of hip prosthesis", *J. Biomed. Mater. Res.*, **23**, 299-310 (1989).
8. R. Yaparalvi, S.K. Loyalka, J.R. Tompson, "Production of spherical ZrO₂-Y₂O₃ and ZnO particles", *J. Biomed. Mater. Research*, **28**, 1087-1093, (1994).

9. S. Lerouge, O.L. Huk, L'H. Yahia, and L. Sedel, "Characterization of *in vivo* wear debris from ceramic-ceramic total hip arthroplasties", *J. Biomed. Mater. Research*, **32**, 627-633 (1996).
10. S. Lerouge, O. Huk, L'H. Yahia, and L. Sedel, "Ceramic-ceramic and metal-polyethylene total hip replacements", *J. Bone Joint Surg.*, **79B**, 135-139 (1997).
11. P. Campbell, B. Yeom, H. Mckellop, T. Schmalzried, and H. Amstutz, "Isolation of predominantly sub-micron UHMWPE wear particles from periprosthetic tissues", *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**, 127-131 (1995).
12. A.S. Shanbhag, J.J. Jacobs, T.T. Glant, and J.L. Gilbert, "Composition and morphology of wear debris in failed uncemented total hip replacement", *J. Bone Joint Surg.*, **76B**, 60-67 (1994).
13. S.R. Goldring, A.L. Schiller, M.S. Roelke, C.M. Rourke, D.A. O'Neil, and W.H. Harris. "The synovial-like membrane at the bone-cement interface in loose total hip replacement and its proposed role in bone lysis", *J. Bone Joint Surg.*, **65A**, 575-584 (1983).
14. W.A. Jiranek, M. Machado, M. Jasty, D. Jevsevan, H. Wolfe, S.R. Goldring, M. Goldberg, and W.H. Harris, "Production of cytokines around loosened cemented acetabular components". *J. Bone Joint Surg.*, **75A**, 863-879 (1993).
15. S.B. Goodman, R.C. Chin, S.S. Chiou, D.J. Schurman, S.T. Woolson, and M.P. Masada, "A clinical-pathological-biochemical study of the membrane surrounding

- loosened and nonloosened total hip arthroplasties", *Clin. Orthop. Rel. Res.*, **244**, 182-187 (1989).
16. T.T. Glant, J.J. Jacobs, G. Molnar, A.S. Shanbhag, M. Valyon, and J.O. Galente, "Bone resorption activity of particle-stimulated macrophages", *J. Bone Miner. Res.*, **8** (9), 1071-1079 (1993).
 17. K.J. Kim, H.E. Rubash, S.C. Wilson, J.A. D'Antonio, and E.J. McClain, "A histologic and biochemical comparison of the interface tissues in cementless and cemented hip prostheses", *Clin. Orthop. Rel. Res.*, **287**, 142-152 (1993).
 18. S.M. Horowitz and M.A. Purdon, "Mediator interactions in macrophage/particulate bone resorption", *J. Biomed. Mat. Res.*, **29**, 477-484 (1995).
 19. T.S. Thronhill, R.M. Ozuna, S. Shirkroff, K. Keller, C.B. Sledge, and M. Spector, "Biochemical and histological evaluation of the synovial-like tissue around failed (loose) total joint replacement prostheses in human subjects and a canine model", *Biomaterials*, **11**, 69-72 (1991).
 20. M.J. Perry, F.M. Ponsford, F.Y. Mortuza, I.D. Learmonth, R.M. Atkins, and C.J. Elson, "Osteolytic properties of the synovial-like tissue from aseptically failed joint prostheses", *Br. J. Rheum.*, **35**, 943-950 (1996).
 21. J. Chiba, H.E. Rubash, K.J. Kim, and Y. Iwaki, "The characterization of cytokines in the interface tissue obtained from failed cementless total hip arthroplasty with and without femoral osteolysis", *Clin. Orthop. Rel. Res.*, **300**, 304-312 (1994).

22. D.W. Howie, D.R. Haynes, S. Hay, S.D. Rogers, M.J. Percy, "The effect of titanium alloy and cobalt chrome alloy wear particles on production of inflammatory mediators IL-1 , TNF , IL-6 and prostaglandin E_2 by rodent macrophages *in vitro*", *Trans. ORS*, **38**, 344 (1992).
23. Y. Nakashima, T. Shuto, K. Hayashi, T. Hotokebuchi, K. Yasuda, Y. Sugioka, "The stimulation effects of ceramic particles on the production of the bone-resorbing mediators *in vitro*", *Trans. ORS*, **41**, 780 (1995).
24. Y. Harada, V.A. Doppalapudi, A.A. Willis, M. Jasty, W.H. Harris and S.R. Goldring, "Human macrophage response to polyethylene particles *in vitro*, a new experimental model", *Trans. ORS*, **40**, 842 (1994).
25. D.W. Howie, S.D. Rogers, D.R. Haynes, and M.J. Percy, "The role of small polyethylene wear particles in inducing the release of mediators known to stimulate bone resorption", *Trans. ORS*, **40**, 201 (1994).
26. D.W. Murray, N. Rushton, "Macrophages stimulate bone resorption when they phagocytose particles", *J. Bone Joint Surg.*, **72-B (6)**, 988-992 (1990).
27. E.L. De Boer, R.F.M. Bevers, K.H. Kurth, and D.H.J. Schamhart, "Double Fluorescent Flow Cytometry Assessment of Bacterial Internalization and Binding by Epithelial Cells", *Cytometry*, **25**, 381-387 (1996).
28. D.A. Drevets, and P.A. Campbell, "Macrophage phagocytosis: use of fluorescence microscopy to distinguish between extracellular and intracellular bacteria", *J. Immunol. Methods*, **142**, 31-38 (1991).

29. M. Ichinose, N. Hara, M. Sawada, T. Maeno, "A Flow Cytometric Assay Reveals an Enhancement of Phagocytosis by Platelet Activating Factor in Murine Peritoneal Macrophages", *Cell. Immunol.*, **156**, 508-518 (1994).
30. S.M. Horowitz, and J.B. Gonzales, "Effects of Polyethylene on Macrophages", *J. Biomed. Mater. Res.*, **15**, 20-56 (1997).
31. T.A. Blaine, R.N. Rosier, J.E. Puzas, R.J. Looney, P.R. Reynolds, S.D. Reynolds, and R.J. O'Keefe, "Increased Levels of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-6 Protein and Messenger RNA in Human Peripheral Blood Monocytes due to Titanium Particles", *J. Bone Joint Surg.*, **78A**, 1181-1191 (1996).
32. S.C. Manolagas, "Role of Cytokines in Bone Resorption", *Bone*, **17** (2), 63S-67S (1995).

CHAPITRE 5: Étude de la cytotoxicité et des médiateurs inflammatoires (Article 2)

Après la phagocytose, la réponse des macrophages aux particules se traduit par la mort et/ou la sécrétion de médiateurs inflammatoires. Ces médiateurs jouent alors un rôle prépondérant dans l'ostéolyse périprothétique. Aussi, le but de l'article 2, intitulé **"Cytotoxicity and macrophage cytokine release induced by ceramic and polyethylene particles *in vitro*"** et soumis au "Journal of Bone and Joint Surgery (American)", est d'analyser la sécrétion de différents médiateurs inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β et TNF- α) par tests ELISA, parallèlement à la mortalité cellulaire induite par ces mêmes particules. Comme dans le premier article, nous avons utilisé la cytométrie en flux pour analyser la toxicité des particules, mais les concentrations analysées ici étaient plus élevées. Elles correspondaient ainsi aux concentrations nécessaires pour obtenir un taux significatif de médiateurs inflammatoires. Enfin, les effets de taille, concentration et composition des particules ont aussi été analysés.

ARTICLE 2

CYTOTOXICITY AND MACROPHAGE CYTOKINE RELEASE INDUCED BY CERAMIC AND POLYETHYLENE PARTICLES *IN VITRO*

Isabelle Catelas, Alain Petit, Richard Marchand, L'Hocine Yahia, and^{*}Olga L. Huk

Isabelle Catelas, Institute of Biomedical Engineering

L'Hocine Yahia, Department of Mechanical Engineering

École Polytechnique de Montréal, Biomechanics/Biomaterials Research Group,

P.O. Box 6079, Succ. "Centre-Ville", Montréal, Québec, H3C-3A7, Canada.

Alain Petit, Orthopaedic Research Unit, Lady Davis Institute for Medical Research

^{*}Olga L. Huk, Division of Orthopaedic Surgery, McGill University

Sir Mortimer B. Davis - Jewish General Hospital

3755 Ch. Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec, H3T-1C5, Canada

Phone: (514) 340-8222, Ext: 3605, Fax: (514) 340-7502

Richard Marchand

Institut de Cardiologie, 5000 Est Rue Bélanger, Montréal, Québec, H1T-1C8, Canada.

^{*}To whom correspondence should be addressed

5.1 ABSTRACT

Although macrophage response to polyethylene debris has been widely studied, it has never been compared to the cellular response to ceramic debris. The aim of this study was to investigate the cytotoxicity of ceramic particles (Al_2O_3 and ZrO_2) and analyze their ability to stimulate the release of inflammatory mediators compared to high density polyethylene particles (HDP). Effects of particle size, concentration and composition were analyzed using an *in vitro* model. The J774 mouse macrophage cell line was exposed to commercial particles in the phagocytosable range (up to $4.5\ \mu\text{m}$). Al_2O_3 was compared to ZrO_2 at $0.6\ \mu\text{m}$ and to HDP at $4.5\ \mu\text{m}$. Cytotoxicity tests were conducted using flow cytometry and macrophage cytokine release was measured by ELISA. Cell mortality increased with Al_2O_3 particle size and concentration. When comparing Al_2O_3 and ZrO_2 at $0.6\ \mu\text{m}$, we did not detect any significant difference at the concentrations we analyzed (up to 2500 particles per macrophage), and mortality remained very low (less than 10%). $\text{TNF-}\alpha$ release also increased with Al_2O_3 particle size and concentration, reaching a 925 % of stimulation at $4.5\ \mu\text{m}$ and 150 particles per cell. With regards to composition, $\text{TNF-}\alpha$ release was higher with HDP than with Al_2O_3 particles at $4.5\ \mu\text{m}$. However, we did not detect any significant difference in $\text{TNF-}\alpha$ between Al_2O_3 and ZrO_2 at $0.6\ \mu\text{m}$. Interleukine 1α and β were not detected after exposure to ceramic as well as HDP particles.

5.2 INTRODUCTION

It is well accepted that aseptic loosening is the most common cause of Total Hip Arthroplasty (THA) failure^{9,26}. Wear debris plays an important role in initiating this phenomenon and polyethylene has been recognized to be the main culprit^{5,12,17,23}. Indeed, many *in vivo* studies have demonstrated an inflammatory response to polyethylene particles^{2,10,16}, characterized by macrophage phagocytosis of the particles and leading to the release of mediators that induce bone resorption.

In 1969, Pierre Boutin introduced the use of ceramic bearing THAs as an alternative to the classic metal-polyethylene (MPe) articulating interface⁴. The *in vivo* wear rate of the ceramic-ceramic (CC) joint couple is 4000 fold less than that of the MPe joint couple⁷. Although ceramics are considered more bioinert than HDP, very little is known about their effect on macrophage response. It has been demonstrated *in vitro* that ceramic particles (Al_2O_3 and hydroxyapatite) can induce IL-1 α , IL-6 and TNF- α release²¹, but particle sizes used in this study were not representative of sizes generated *in vivo*^{5,19,22}. A previous study performed in our laboratory evaluating pseudomembranes (PMs) harvested at revision of CC THAs revealed that, when present in large concentrations, ceramic particles generated *in vivo* can initiate an inflammatory response in periprosthetic tissue²⁰.

In order to eliminate confounding factors inherent to *in vivo* studies, we designed an *in vitro* model to prospectively study the response of macrophages to ceramic particles (Al_2O_3 and ZrO_2) and compare them with HDP particles. Many of the problems encountered in *in vivo* studies are due to the differences in the sizes, numbers and mixture of material compositions of the particles used. We analyzed the effects of these particles on macrophages, as macrophages play a central role in the response to wear particles. They represent 60 to 80% of the cell population of PMs harvested at revision surgery and are known to release a large number of inflammatory mediators, which stimulate bone resorption¹⁸. Of all the inflammatory mediators, tumor necrosis factor ($\text{TNF-}\alpha$), $\text{IL-1}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ have been widely found in PMs from failed THAs^{6,14,25,27}. However, very few *in vitro* studies analyzed these inflammatory mediators after exposure to particles. Horowitz *et al.* have demonstrated that exposure of J774 macrophages to polymethymethacrylate (PMMA) particles leads to the release of $\text{TNF-}\alpha$ but not to $\text{IL-1}\alpha$ or β ¹⁴. In contrast, Nakashima *et al.* demonstrated that after exposure to ceramic particles, J774 macrophages release $\text{IL-1}\alpha$, IL-6 and $\text{TNF-}\alpha$ ²¹.

The aim of this study was to investigate the cytotoxicity in terms of cell mortality of ceramic particles using flow cytometry, and to analyze their ability to stimulate the release of $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ in comparison with HDP particles. Effects of particle size, concentration and composition were analyzed.

5.3 MATERIALS AND METHODS

5.3.1 Particles

Al_2O_3 (Alcan (Jonquières, Québec, Canada), Alcoa (Bauxite, AK, USA), Durmax (Chatellerault, France)), ZrO_2 partially stabilized with yttrium (Unitec Ceramics (Stafford, England)) and HDP particles (Shamrock Technologies (Newark, NJ, USA)) were commercially obtained in the phagocytosable range : 0.6 (Alcan), 1.3 (Alcoa), 2.4 (Alcan) and 4.5 μm (Durmax) for Al_2O_3 , 0.6 μm for ZrO_2 (Unitec Ceramics) and 4.5 μm for HDP (Shamrock Technologies). Particles were sterilized by ethylene oxide.

5.3.2 Cell culture

The J774 murine macrophage cell line (ATCC, Rockville, MD, USA) was used in this *in vitro* model because it has been demonstrated to be morphologically similar to macrophages at the bone-cement interface and to respond to cement in a similar way as macrophages at the interface^{3,13}.

Macrophages were cultured and maintained in RPMI 1640 tissue culture medium (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin. Cells were exposed to particles in tubes containing 4×10^5 cells in 1 ml of culture medium with a particle suspension at concentrations varying from 5 to 2500 particles per macrophage.

Culture tubes without particles served as negative controls. Incubations were conducted for 24 hours at 37⁰C in a 5% CO₂ environment. The resulting conditioned supernatants were collected for ELISA tests and frozen at - 70⁰C. Cells were then washed with PBS (pH 7.2) and stained with propidium iodide (PI) for 4 min at room temperature. Cells were again washed and data for cytotoxicity tests was collected using flow cytometry.

5.3.3 Flow cytometry

An air-cooled 488 nanometer lengthwave laser flow cytometer (FACScan, Becton Dickinson, Palo Alto, CA, USA) was used for data collection. A minimum of 2000 cells were evaluated per test, in list mode.

The cytotoxic effect of particle stimulation on macrophages, evaluated as **cell mortality**, is obtained by measuring the percentage of fluorescent dead macrophages stained with propidium iodide (PI). Markers 1 and 2 (M1 and M2) define the range of live and dead cells respectively (Figures 5.1A and 5.1B), and cell percentages are calculated by the computer in analysis mode.

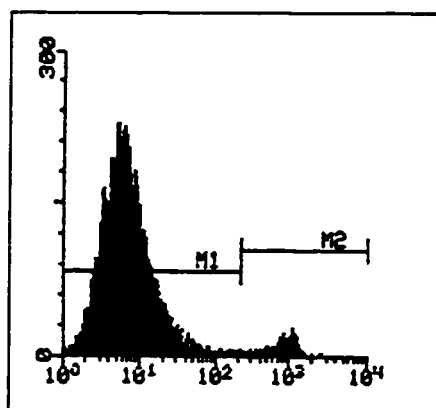


Figure 5.1A

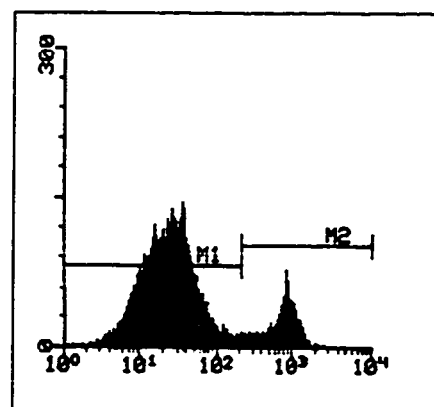


Figure 5.1B

Figure 5.1. Flow cytometric data acquisition of cytotoxicity tests. J774 macrophages were incubated 24 hours without particles (control - Figure 5.1A), and with Al_2O_3 at the concentration of 250 particles per cell and at $2.4 \mu\text{m}$ (Figure 5.1B). Markers 1 and 2 (M1 and M2) define the range of live and dead cells respectively.

5.3.4 Inflammatory mediator tests

Concentrations of $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\alpha$, and $\text{IL-1}\beta$ in the supernatants of cell cultures were measured using ELISA kits (Genzyme, Cambridge, MA, USA). All the kits are enzyme-linked immunosorbent assay kits that are murine specific. The technique is a solid-phase enzyme immunoassay that employs the multiple antibody sandwich principle. The detection limits of the assays are 15 pg/ml to 405 pg/ml for $\text{IL-1}\alpha$, 15 to 960 pg/ml for

IL-1 β and 35 to 2240 pg/ml for TNF- α . Kits are specific enough to avoid cross reactivity of other recombinant cytokines.

5.3.5 Statistical analysis

Effect of particle size was analyzed at three different sizes for cytotoxicity and four different sizes for mediator release. The influence of particle concentration was evaluated for a wide range of concentrations, up to 2500 particles per cell. Statistical significance was calculated using the paired student-t test ($p < 0.05$). Each test is the mean of 2-3 experiments performed in duplicate.

5.4 RESULTS

5.4.1 Cytotoxicity

Figure 5.2 presents the effects of Al₂O₃ particle size and concentration on macrophage mortality. Results reveal that mortality increases with particle concentration and is higher for bigger particles. To obtain any given percentage of cell death, we needed a much higher concentration of particles at 1.3 μ m, compared to particles at 2.4 μ m. We obtained an almost equivalent percentage mortality ($\approx 30\%$) with particles at 1.3 μ m and 1500 particles per cell as with particles at 2.4 μ m and 500 particles per cell.

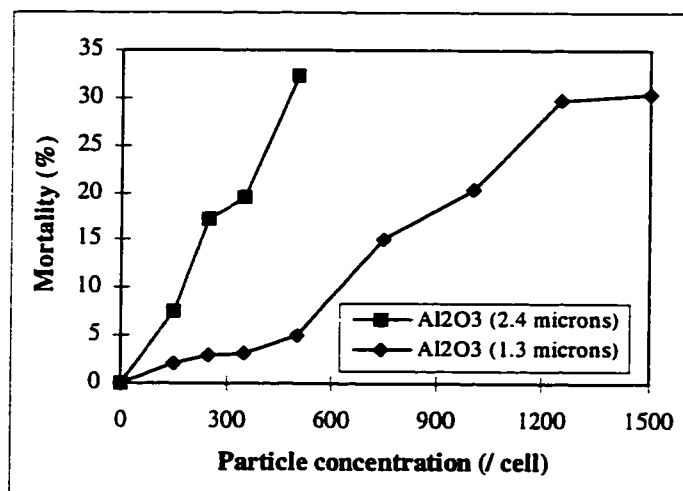


Figure 5.2. Effect of Al₂O₃ particle size and concentration on cell mortality. J774

macrophages were incubated 24 hours in presence of increasing concentrations of Al₂O₃ at 1.3 μ m and 2.4 μ m. Results are the mean of 3 experiments performed in duplicate.

5.4.2 Inflammatory mediators

The effects of Al₂O₃ particle size and concentration on TNF- α release are illustrated in Figure 5.3 and 5.4 respectively. The mediator release results parallel those of cytotoxicity. The amount of TNF- α increased with particle size, especially for the largest size (4.5 μ m). Exposure of macrophages to Al₂O₃ particles at 4.5 μ m and 150 particles per cell led to a TNF- α release of 925 % of control, whereas macrophages exposure to Al₂O₃ at 1.3 μ m led to a TNF- α release of 135 % of control at the same concentration (Figure 5.3). When controlling for size at 1.3 μ m, there is a direct relation between TNF-

α release and particle concentration (Figure 5.4). At 1500 particles per cell, exposure to Al_2O_3 particles stimulated TNF- α release at 250 % of control, whereas at 5 particle per cell, stimulation was only 105 % of control. As particle concentration increases, TNF- α release also increases.

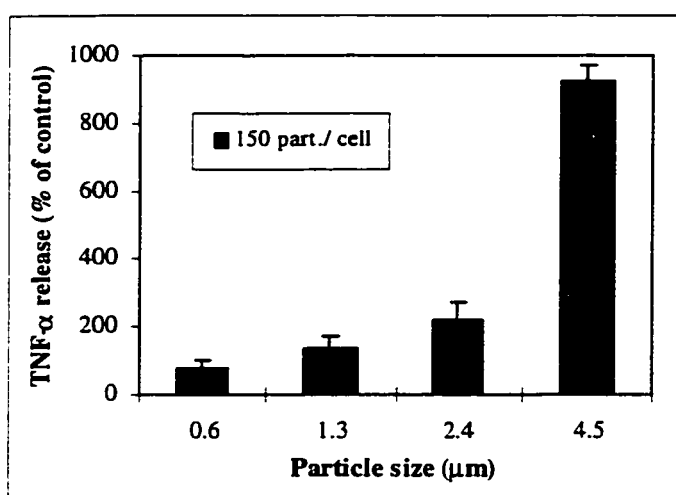


Figure 5.3. Effect of Al_2O_3 particle size on TNF- α release. J774 macrophages were incubated with Al_2O_3 particles at sizes vaying from 0.6 to 4.5 μm and at the concentration of 150 particles per macrophage. Results are the mean of 3 experiments performed in duplicate.

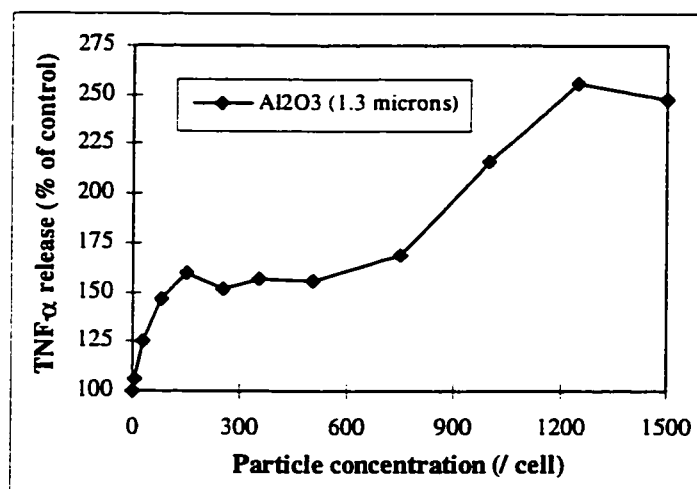


Figure 5.4. Effect of Al_2O_3 particle concentration on TNF- α release. J774 macrophages were incubated with Al_2O_3 particles at 1.3 μm and at concentrations vaying from 5 to 1500 particles per macrophage. Results are the mean of 2 experiments performed in duplicate.

Figure 5.5 presents the effect of particle composition on TNF- α release. We did not detect any difference in release of TNF- α between Al_2O_3 and ZrO_2 particles at 0.6 μm (Figure 5.5A) and the rate of stimulation stayed at a low level (≈ 165 % of control at a concentration of 2500 particles per cell). However, there was a significant difference in the release of TNF- α between Al_2O_3 and HDP at 4.5 μm ($p < 0.05$) (Figure 5.5B). At 30 particles per cell, TNF- α release after incubation with Al_2O_3 and HDP particles was approximately 130 % and 260% of control respectively. For HDP concentrations higher than 80 particles per macrophage, TNF- α release reaches a plateau.

We did not measure any detectable IL-1 α and IL-1 β after macrophage exposure to ceramic as well as HDP particles.

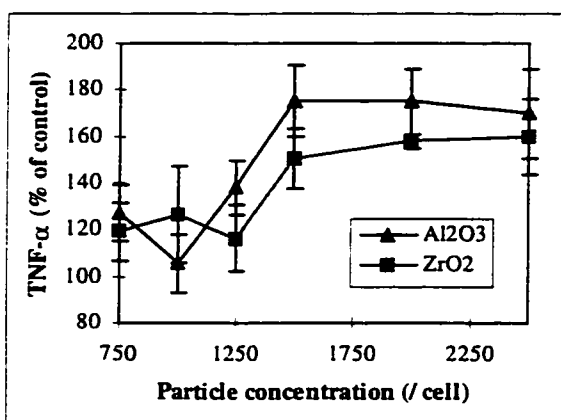


Figure 5.5A

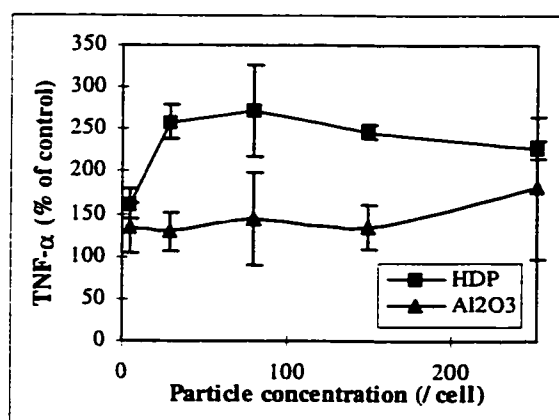


Figure 5.5B

Figure 5.5. Effect of particle composition on TNF- α release. J774 macrophages were incubated with Al₂O₃ and ZrO₂ particles at 0.6 μ m and concentrations up to 2500 particles per macrophage (Figure 5.5A), and with Al₂O₃ and HDP particles at 4.5 μ m and concentrations up to 250 particles per macrophage (Figure 5.5B). Results are the mean of 3 experiments performed in duplicate.

5.5 DISCUSSION

In this study, we evaluated the effect of particle size, concentration and composition on macrophage mortality and cytokine release (TNF- α , IL-1 α and IL-1 β). We found size and concentration dependent stimulatory effects of phagocytosable particles on macrophages and our findings are consistent with those in the literature^{8,24}. While our

experiments indicated no significant difference between Al_2O_3 and ZrO_2 ceramic particles on macrophage response (Figure 5.5A), cytokine release was significantly higher with HDP than with Al_2O_3 particles at the same size and concentration (Figure 5.5B). We did not detect any effect of the particles on $\text{IL-1}\alpha$ and β macrophage release.

Our choice of flow cytometry for assessing cytotoxicity has the following major advantages for *in vitro* biocompatibility testing: (1) analysis is conducted at the single cell level; (2) large numbers of cells are analyzed at an extremely rapid rate; (3) all measurements are quantitative and objective; and (4) multiple cell parameters can be evaluated simultaneously. The major technical limitation for the use of flow cytometry is in the large particle size and concentration ranges (greater than $2.5\text{ }\mu\text{m}$ at concentrations over 500 particles) since agglomerated particles approaching cellular sizes can be mistaken as a cell by the flow cytometer. For example, the agglomeration of 4 particles at $4.5\text{ }\mu\text{m}$ has the same size as a single macrophage. This is why we did not analyze cell mortality at $2.4\text{ }\mu\text{m}$ for concentrations higher than 500 particles per cell and why we did not compare cytotoxicity after incubation with Al_2O_3 and HDP particles ($4.5\text{ }\mu\text{m}$). However, over 90% of wear debris generated *in vivo* is submicronic^{5,19,22}, and it is this parameter range that is ideal for evaluation of cellular response by flow cytometry.

The demonstration of a direct relation between cytotoxicity and particle size and concentration can be translated to a volume effect. Indeed, to obtain any given

percentage of cell mortality, we needed a much higher concentration of particles at 1.3 μm compared to 2.4 μm (Figure 5.2). We obtained almost the same percentage of mortality at 1.3 μm and 1500 particles per cell as with 2.4 μm and 500 particles per cell. At 0.6 μm , cell mortality was still negligible for concentrations up to 2500 particles per cell. Moreover, the fact that macrophage mortality increased with particle size suggest that for equal concentrations, big particles are more damaging for the cell than small particles.

The TNF- α release results paralleled those of cytotoxicity, showing a direct relationship between particle size and concentration and TNF- α release. However, when comparing the levels of cytotoxicity and TNF- α , we demonstrated that Al_2O_3 at 1.3 μm and at a concentration up to 500 particles per cell induced a relatively low mortality (less than 5%), whereas TNF- α release was over 150% of control. These results demonstrate that TNF- α release is not directly related to cell mortality but is probably secreted by stimulated viable periprosthetic macrophages¹¹. Results also suggest that while the cell's threshold for a deadly particle load is relatively high, the threshold for producing TNF- α in response to a constant particle stimulus is much lower, explaining why TNF- α must be an important mediator implicated in ultimate osteolysis as demonstrated by others^{1,6,13}. Moreover, TNF- α plays a pivotal role in upregulating IL-1, IL-6 and

granulocyte macrophage colony stimulating factor²⁷, thereby amplifying the osteolytic cascade.

With regards to composition, we did not detect any significant difference in mortality as well as in TNF- α release between Al₂O₃ and ZrO₂, which suggests that, in terms of inflammatory reaction, there is no biologic advantage of using one material over the other. However, HDP particles induced a higher TNF- α release than Al₂O₃ particles at the same size and concentration (2.5 times control versus 1.3 times control at 150 particles per macrophage, respectively). The difference in cellular response that we observed with two particles of similar size but of different composition implies that in addition to its capacity to perceive and respond to size and concentration, the cell must have a detection mechanism that is sensitive to composition or some aspect thereof. We hypothesize that for equivalent overall particle size, the more rounded and smoother topology of ceramic particles induces a less cytotoxic effect on the macrophage than the sharper more angular topology of HDP particles.

The fact that TNF- α release reaches a plateau with HDP particles for concentrations higher than 80 particles per cell may be due to the difficulty of optimizing HDP particles availability to the macrophages *in vitro*. Indeed, HDP particles had a propensity to float in culture medium and adhere to the walls of culture tubes¹⁵. To solve this problem, culture tubes were placed in a rotator during incubation, which facilitated constant

contact between cells and HDP particles, but probably did not achieve the exact availability of particles to the cells as is possible *in vivo*. However, the higher level of TNF- α after incubation with HDP particles compared to Al₂O₃ particles suggests that as a material for prosthetic use, ceramics not only have a tribologic advantage, but a biologic advantage as well.

In contrast to TNF- α , we did not find any IL-1 α and β . In reviewing the literature, it appears that while most studies that evaluate membranes harvested *in vivo* detect IL-1 α and/or β ^{6,25}, *in vitro* macrophage stimulation studies rarely detect the release of these cytokines^{1,14}. Furthermore, because both macrophages and bone cells are capable of producing mediators, IL-1 production *in vivo* may originate from bone cells in response to mediators produced by macrophages (like TNF- α), and not from the macrophages directly. Using the same cell line, Algan *et al.* and Horowitz *et al.* were also unable to detect any IL-1 after incubation with cement particles^{6,25}. In contrast, in a recent study by Shanbhag *et al.*, human monocytes were exposed to retrieved and fabricated ultrahigh molecular weight polyethylene particles *in vitro*, and led to the release of IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and PGE₂²⁵. The difference between the results of our study and those of Shanbhag *et al.* may reflect differences in cell type used, type of polyethylene and exposure conditions. Indeed, the authors did not mention any technical points related to polyethylene particle exposure to macrophages and the problem of floatation. Nakashima *et al.* also demonstrated IL-1 release by J774 macrophages following exposure to Al₂O₃

and hydroxyapatite particles²¹. The differences between our results and those of Nakashima *et al.* may reflect differences in particle size since the authors used a wide particle size range from 1 to 1000 μm , which does not reflect the smaller size range generated *in vivo*^{5,19,22}.

In summary, the results of the present study indicate that particle stimulated macrophages appear to be sensitive to particle size and concentration, suggesting a volume effect. With regards to composition, we did not demonstrate any significant difference between ceramics. However, HDP particles induced a significantly greater release of TNF- α compared to Al_2O_3 , implying not only a tribologic advantage in the use of ceramics for THAs but a biologic advantage as well.

Lastly, the release of mediators by macrophages following exposure to ceramic and HDP particles may involve specific mediators which do not include IL-1 but TNF- α should remain a specific marker for the characterization of macrophage response to HDP and Al_2O_3 particle exposure.

5.6 REFERENCES

1. **Algan, S.M.; Purdon, M., and Horowitz S.M.:** Role of tumor necrosis factor alpha in particulate-induced bone resorption. *J. Orth. Res.*, 14(1): 30-35, 1996.

2. **Averbuch S.D.:** New biphosphonates in the treatment of bone metastases. *Cancer.*, 72: 3443-3452, 1993.
3. **Bockman, R.S.:** Prostaglandin production of human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages: Synthesis dependent on in vitro culture conditions. *Prostaglandins*, 21: 9-31, 1981.
4. **Boutin, P.:** Arthroplastie totale de hanche par prothèse en alumine frittée. *Rev. Chir. Orthop.*, 58: 229-246, 1972.
5. **Campbell, P.; Yeom, B.; Mckellop, H.; Schmalzried, T.; and Amstutz, H.:** Isolation of predominantly sub-micron UHMWPE wear particles from periprosthetic tissues. *J. Biomed. Mater. Res.*, 29: 127-131, 1995.
6. **Chiba, J., Rubash, H.E., Kim, K.J.K., and Iwaki, Y:** The characterization of cytokines in the interface tissue obtained from failed cementless total hip arthroplasty with and without femoral osteolysis. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 300: 304-312, 1994.
7. **Dorlot, J.M.; Christel, P.; and Meunier, A.:** Wear analysis of retrieved alumina heads and sockets of hip prostheses. *J. Biomed. Mater. Res.*, 23: 299-310, 1989.
8. **Glant, T.T.; Jacobs, J.J; Molnar, G.; and Shanbhag, A.R.:** Bone Resorption Activity of Particulate-Stimulated Macrophages. *J. Bone Miner. Res.*, 8(9): 1071-1079, 1993.
9. **Goodman, S.B.; Chin, R.C.; Chiou, S.S.; Schurman, D.J.; Woolson, S.T.; and Masada, M.P.:** A clinical-pathologic-biochemical study of the membrane

surrounding loosened and nonloosened total hip arthroplasties. *Clin. Orthop.*, 244: 182-187, 1989.

10. **Goodman, S.; Wang, J.S.; Regula, D.; and Aspenberg, P.:** T-lymphocytes are not necessary for particulate polyethylene-induced macrophage recruitment: histologic studies of the rat tibia. *Acta Orthop. Scand.*, 65: 157-160, 1994.
11. **Haynes, D.; Rogers, S.; Hay, S.; Pearcy, M.; and Howie, D.:** The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium-alloy wear particles. *J. Bone Joint Surg.*, 75-A: 825-834, 1993.
12. **Hernandez, J.R., Keating, E.M., Faris, P.M., Meding, J.B., and Ritter, M.A.:** Polyethylene wear in uncemented acetabular components. *J. Bone Joint Surg.*, 76-B: 263-266, 1994.
13. **Horowitz, S.M.; Doty, S.B.; Lane, J.M.; and Burstein, A.H.:** Studies of the mechanism by which the mechanical failure of polymethylmethacrylate leads to bone resorption. *J. Bone Joint Surg.*, 75-A: 802-813, 1993.
14. **Horowitz, S.M.; and Purdon, M.A.:** Mediator interactions in macrophage/particulate bone resorption. *J. Biomed. Mater. Research*, 29 (4): 477-484, 1995.
15. **Horowitz, S.M.; and Gonzales, J.B.:** Effects of Polyethylene on Macrophages. *J. Orthop. Res.*, 15: 50-56, 1997.

16. **Howie, D.W., Manthey, B.; Hay, S.; and Vernon-Roberts, B.:** The synovial response to intraarticular injection of polyethylene wear particles. *Clin. Orthop.*, 292: 352-357, 1993.
17. **Jasty, M.; Bragdon, C.; Jiranek, W.; Chandler, H.; Maloney, W.; and Harris, W.H.:** Etiology of osteolysis around porous-coated cementless total hip arthroplasties. *Clin. Orthop.*, 308: 111-126, 1994.
18. **Jiranek, W.A., Machado, M., Jasty, M., Jevsevar, D., Wolfe, H.J., Goldring, S.R., Goldberg, M.J., and Harris WH.:** Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. Analysis with immunohistochemical techniques and in situ hybridization . *J. Bone Joint Surg. (Am)*, 75(6): 863-79, 1993.
19. **Lerouge, S.; Huk, O.; Yahia, L'H.; and Sedel, L.:** Characterization of in vivo wear debris from ceramic-ceramic total hip arthroplasties. *J. Biomed. Mater. Research*, 32: 627-633, 1996.
20. **Lerouge, S.; Huk, O.; Yahia, L'H.; and Sedel, L.:** Ceramic-ceramic and metal-polyethylene total hip replacements, *J. Bone Joint Surg.*, 79-B: 135-139, 1997.
21. **Nakashima, Y.; Shuto, T.; Hayashi, K.; Hotokebuchi, T.; Yasuda, K.; and Sugioka, Y.:** The stimulatory effects of ceramic particles on the production of the bone resorbing mediators *in vitro*. *Trans ORS*, 41: 780, 1995.
22. **Pizzoferrato, A., Stea, S., Sudanese, A., Toni, A., Nigrisoli, M., Gualtieri, G., and Squarzoni, S.** Morphometric and microanalytical analyses of alumina wear particles in hip prostheses. *Biomaterials*, 14: 583-587, 1993.

23. **Santavirta, S.; Nordstrom, D.; Metsarinne, K.; and Konttinen, Y.T.:** Biocompatibility of polyethylene and host response to loosening of cementless total hip replacement. *Clin. Orthop.*, 297: 100-110, 1993.
24. **Shanbhag, A.S.; Jacobs, J.J.; Black, J.; Galante, J.O.; and Glant, T.T.:** Macrophage-particle interactions: Effect of size, composition and surface area. *J. Biomed. Mater. Research*, 28: 81-90, 1994.
25. **Shanbhag, A.S.; Jacobs, J.J.; Black, J.; Galante, J.O.; and Glant, T.T.:** Human monocyte response to particulate biomaterials generated *in vivo* and *in vitro*. *J. Orthop. Res.*, 13: 792-801, 1995.
26. **Willert, H.G.; and Semlitsch, M.:** Reactions of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses. *J. Biomed. Mater. Res.*, 11: 157-164, 1977.
27. **Xu, J.W.; Konttinen, Y.T.; Lassus, J.; Natah, S.; Ceponis, A.; Solovieva, S.; Aspenberg, B.; and Santavirta, S.:** Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in loosening of total hip replacement (THR). *Clin. Exp. Rheumatol.*, 14(6): 643-648, 1996.

CHAPITRE 6: Étude de la mortalité des macrophages par apoptose (Article 3)

Par cytométrie en flux et tests Elisa, nous avons montré que la phagocytose, la mortalité cellulaire et le relargage de médiateurs inflammatoires augmentaient avec la taille et la concentration des particules. Cependant, les mécanismes par lesquels les cellules meurent demeurent encore inconnus. Dans l'article 3, intitulé **"Induction of macrophage apoptosis by ceramic and polyethylene particles *in vitro*"** et soumis au "Journal of Orthopaedic Research", nous avons donc analysé la mort cellulaire par apoptose. Le but ultime de cette étude est de parvenir à contrôler thérapeutiquement l'ostéolyse périprothétique par modulation des événements cellulaires conduisant à l'ostéolyse. Comme pour les tests de phagocytose, de cytotoxicité et médiateurs inflammatoires, nous avons analysé les effets de taille, concentration et composition des particules. La combinaison de ces trois articles nous a permis de retracer l'ensemble de la réponse des macrophages *in vitro* aux particules de céramiques et polyéthylène.

ARTICLE 3**INDUCTION OF MACROPHAGE APOPTOSIS BY CERAMIC AND
POLYETHYLENE PARTICLES *IN VITRO***

Isabelle Catelas, Alain Petit, Richard Marchand, L'Hocine Yahia, and *Olga L. Huk

Isabelle Catelas, Institute of Biomedical Engineering

L'Hocine Yahia, Department of Mechanical Engineering

École Polytechnique de Montréal, Biomechanics/Biomaterials Research Group,

P.O. Box 6079, Succ. "Centre-Ville", Montréal, Québec, H3C-3A7, Canada.

Alain Petit, Orthopaedic Research Unit, Lady Davis Institute for Medical Research

*Olga L. Huk, Division of Orthopaedic Surgery, McGill University

Sir Mortimer B. Davis - Jewish General Hospital

3755 Ch. Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec, H3T-1C5, Canada

Phone: (514) 340-8222, Ext: 3605, Fax: (514) 340-7502

Richard Marchand

Institut de Cardiologie, 5000 Est Rue Bélanger, Montréal, Québec, H1T-1C8, Canada.

*To whom correspondence should be addressed

6.1 SUMMARY

The purpose of this study was to investigate *in vitro* the presence of apoptotic cell death after macrophage stimulation with different ceramic (Al_2O_3 and ZrO_2) and high density polyethylene (HDP) particles. We also analyze the effects of particle size, concentration, and composition. The J774 mouse macrophage cell line was exposed to commercial particles at different sizes (up to $4.5\ \mu\text{m}$) and different concentrations. Fluorescence microscopy and DNA laddering were used to investigate the presence of apoptosis in our cell cultures after 24 hours of incubation. Fluorescence microscopy of propidium iodide stained cells showed the characteristic morphological features that occur in apoptotic cells, namely cell shrinkage and nuclear condensation. The effect of ceramic particles on apoptotic cell morphology was concentration- and size-dependent. With regards to composition, we did not find any difference in cell morphology between Al_2O_3 and ZrO_2 . Ceramic and HDP particles induced DNA fragmentation into oligonucleosomes as evidenced by DNA laddering, another characteristic of apoptosis. The induction of DNA ladders was also concentration- and size-dependent whereas particle composition (Al_2O_3 vs ZrO_2 and Al_2O_3 vs HDP) had no effect. These results suggest that macrophage responds to an overall particle volume rather than an absolute particle number. Lastly, the induction of macrophage apoptosis, or programmed cell death, by ceramic and HDP particles identifies a new specific target point for therapeutic modulation of debris-induced periprosthetic osteolysis.

6.2 INTRODUCTION

Osteolysis inducing aseptic loosening is the main cause of Total Hip Arthroplasty (THA) failure. Although there have been some studies on the potential effects of drugs, at the present time, there is no therapeutic treatment to solve this problem. Osteolytic lesions consist of a foreign-body inflammatory response to particulate wear debris enunciated by the appearance of a proliferating pseudomembrane (PM) around a prosthesis (8). The macrophage, which represents 60-80% of the cell population of PM harvested at revision surgery (20), is the key cell responsible for many of the events associated with osteolysis. Many studies evaluating tissue at the interface between implant and bone from failed THA have demonstrated association between macrophages and areas of bone resorption (1,12,19,29). Indeed, phagocytosis of particulate debris by macrophages incites a cascade of events that results in the release of PGE₂ and osteolytic cytokines (IL-1, IL-6 and TNF- α) capable of stimulating bone resorption (4,7,8,9,14,20,23,28,33).

Of all this debris, polyethylene has been the main culprit in initiating osteolysis (10,15,16). Although ceramics have been considered more bioinert than polyethylene, little is known about the stimulatory effects of particulate ceramics on macrophages, and the *in vitro* macrophage response to polyethylene and ceramic particles has never been compared. Previous studies in our laboratory evaluating pseudomembranes retrieved at revision surgery of ceramic-ceramic THAs revealed that ceramic-ceramic joint couple generated less debris and a less intense inflammatory reaction than metal-polyethylene

joint couple (25,26). However, this study also demonstrated that when present in large concentration, ceramic particles generated *in vivo* can also initiate an intense inflammatory response in periprosthetic tissue. To eliminate the many clinical confounding factors inherent to *in vivo* studies, we designed an *in vitro* model to characterize the response of macrophages to ceramic and polyethylene particles. Recent work in our laboratory using flow cytometry demonstrated that mortality increases with particle size and concentration (2). However, the mechanisms by which cells die remain unknown.

Cell death induced by cytotoxic agents may take the form of either apoptosis or necrosis (24). Apoptosis is an active form of cell death and requires the participation of cellular processes (22). This is in contrast to the classic textbook form of necrosis which is a passive form of cell death (35). The recent explosion of interest in apoptosis lies in the fact that it is under positive and negative regulation and offers specific targets for therapeutic intervention (6,34). Treatments designed to specifically alter the apoptotic threshold (that means to enhance or decrease the susceptibility of individual cell types to undergo apoptosis) may have the potential to change the natural progression of some diseases (32). Our results of phagocytosis using flow cytometry showed a characteristic shift in cell size after incubation with particles compatible with apoptosis (personal unpublished data).

The purpose of this study was to open doors for possible modulation of osteolysis in PTHs by investigating the presence of apoptotic cell death after macrophage stimulation with different ceramic (Al_2O_3 and ZrO_2) and high density polyethylene (HDP) particles.

6.3 MATERIALS AND METHODS

6.3.1 Particles

Al_2O_3 (Alcan, Jonquières, Québec, Canada; Alcoa, Bauxite, AK, USA; Durmax, Chatellerault, France), ZrO_2 partially stabilized with yttrium (Unitec Ceramics, Stafford, England) and HDP particles (Shamrock Technologies, Newark, NJ, USA) were commercially obtained in the phagocytosable range : 0.6 (Alcan), 1.3 (Alcoa), 2.4 (Alcan) and 4.5 μm (Durmax) for Al_2O_3 , 0.6 μm for ZrO_2 (Unitec Ceramics) and 4.5 μm for HDP (Shamrock Technologies). Particles were sterilized by ethylene oxide.

6.3.2 Cell culture

The J774 murine macrophage cell line (ATCC, Rockville, MD, USA) was used in this study. Macrophages were cultured and maintained in RPMI 1640 tissue culture medium (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin. J774 cells were exposed to particles in tubes, containing 4×10^6 cells per 10 ml of culture media with

concentrations varying from 5 to 2500 particles per macrophage. Macrophages incubated without particles served as negative controls. Incubations were conducted at 37°C in a 5% CO₂ environment for 24 hours. Cells were washed with PBS at pH 7.4 and analyzed for apoptotic morphology with fluorescence microscopy and for DNA laddering using gel electrophoresis.

6.3.3 Fluorescence microscopy

Macrophages were stained with propidium iodide (PI) for 4 minutes at room temperature and again washed with PBS (pH 7.4). Sections of cells were prepared by centrifugation (cytospine) in order to analyze cell shrinkage and nuclear condensation, two characteristic features of apoptosis (22,24,35). Pictures were taken with an Aristoplan fluorescence microscope (Leitz Wetzlar, Germany), using Kodak films (Ektachrome, 400 ASA). Around 100 cells were analyzed for each condition (5 fields of approximately 20 cells each) at a magnification of 1250X.

6.3.4 DNA laddering

DNA was prepared as recently described by Herrman *et al.* (11) with minor modifications. Briefly, cells were homogenized for 10 seconds in 100 µl Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl - 20 mM EDTA - 1% NP-40, pH 7.4) and centrifuged 5 min at 1600 x g at 4°C. Pellets were reextracted with lysis buffer and centrifuged. Supernatants were

pooled and incubated 2h at 37°C with 20 µg RNase A (Amresco, Solon, OH, USA) and overnight at 50°C with 100 µg proteinase K (Amresco, Solon, OH, USA) to remove RNA and proteins respectively. After addition of 1/10 volume of 3M sodium acetate (pH 5.2), the DNA was precipitated with 2.5 volume ethanol and dissolved in 10 mM Tris-HCl-1mM EDTA, pH 8.0. The samples (5 µg) were loaded onto 1.5% agarose gel containing 50 µg/ml ethidium bromide, run at 50 volts for about 2h on Mupid-2 Minigel (Helixx Technologies, Scarborough, Ontario, Canada). DNA was then visualized directly upon illumination with UV light and photographed using Polaroid type 667 film (ASA 3000).

6.4 RESULTS

6.4.1 Fluorescence microscopy

Figure 6.1 shows macrophages incubated for 24 hours without particles (Figure 6.1A) and with Al₂O₃ particles at 0.6 µm and 150 particles per macrophage (Figure 6.1B). The nuclei of unstimulated macrophages appear normal and plump, with homogeneous uptake of stain. After incubation with the particles, some of the stimulated macrophages reveal characteristic morphological features of apoptosis, namely nuclear shrinkage and condensation with an heterogeneous stain uptake.

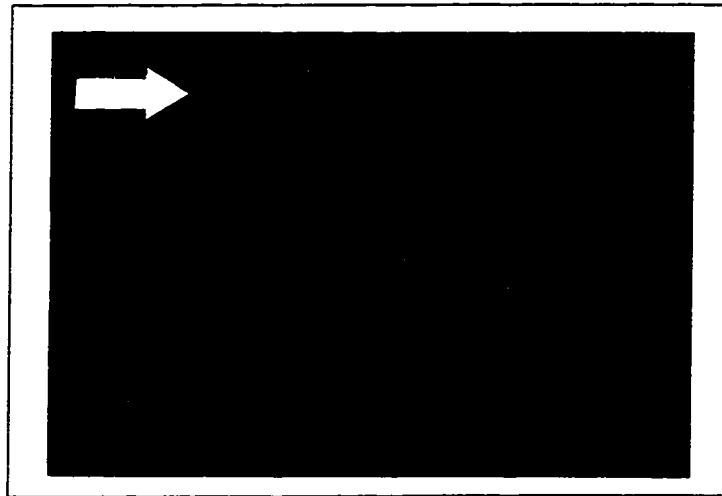


Figure 6.1A

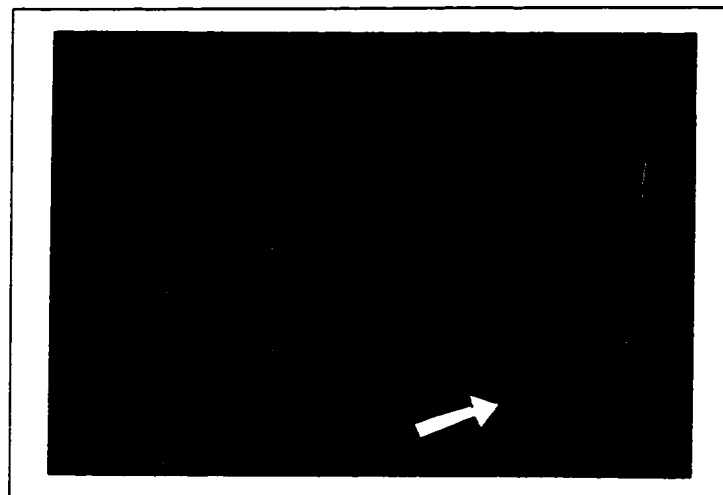


Figure 6.1B

Figure 6.1. *In vitro* stained J774 macrophages with propidium iodide (PI): effect of particle size and concentration. Figure 6.1A shows control cells (macrophages without particles), incubated for 24 hours. Figure 6.1B shows macrophages incubated with Al_2O_3 particles at $0.6\ \mu\text{m}$ and at the concentration of 150 particles per macrophage.

(Large arrow: normal nucleus and small arrow: apoptotic nucleus)

Figure 6.2 demonstrates the effect of particle concentration on macrophage apoptosis. The percentage of apoptotic cells after 24 hours of incubation with Al_2O_3 particles at 1.3 μm and 150 particles per cell (Figure 6.2B) was much higher than at a concentration of 80 particles per cell (Figure 6.2A): 36% vs 27%, respectively, after subtracting the percentage apoptosis in the negative controls.

We also observed an effect of particle size on the appearance of apoptotic morphology. For the same concentration, Al_2O_3 at 1.3 μm (Figure 6.2B) induced a higher percentage of apoptotic cells than Al_2O_3 at 0.6 μm (Figure 6.1B): 36% vs 18%, respectively, after subtracting the percentage apoptosis in the negative controls.

With regards to composition, we did not observe any difference in cell morphology after incubation with the two ceramics (Al_2O_3 vs ZrO_2) for equivalent size and concentrations.

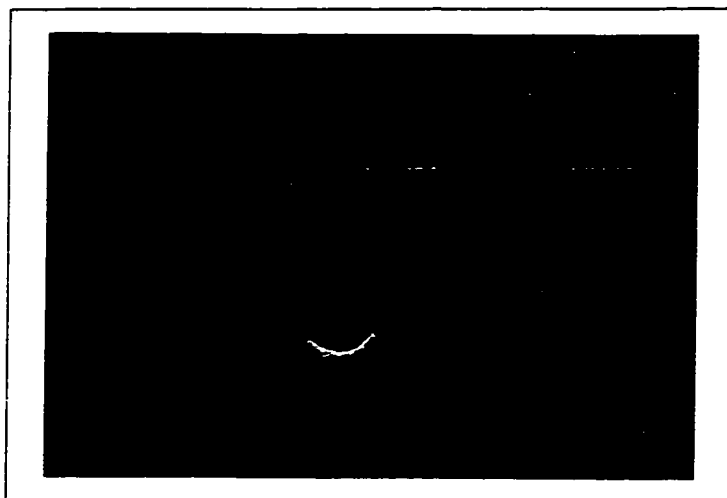


Figure 6.2A

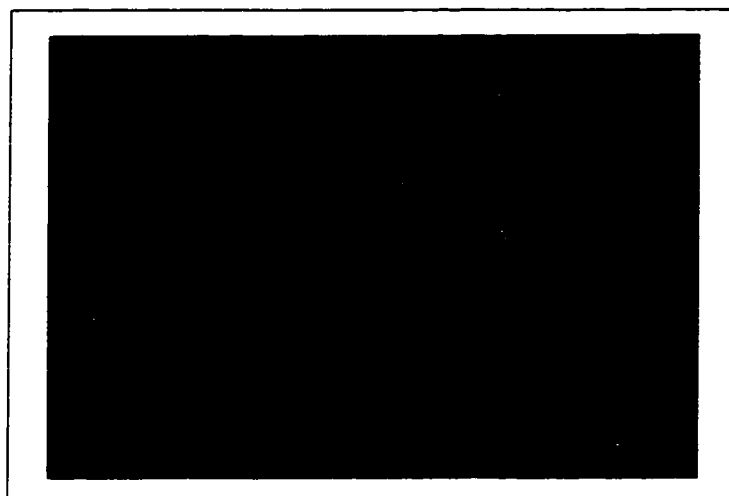


Figure 6.2B

Figure 6.2. Effect of particle concentration on cell morphology. Figures 6.2A and 6.2B show J774 macrophages incubated with Al_2O_3 particles at $1.3\ \mu\text{m}$ and at the concentrations of 80 and 150 particles per macrophage, respectively.

6.4.2 DNA laddering

Figures 6.3 and 6.4 show the effect of Al_2O_3 particle size and concentration on DNA fragmentation. The induction of DNA fragmentation into oligonucleosomes increased with particle size (Figure 6.3) and concentration (Figure 6.4). Apoptotic DNA fragments appeared with particle concentration as low as 80 per macrophage at particle size of 1.3 μm , but was very low for the lowest concentrations.

While the intensity of DNA laddering was clearly size and concentration dependent, we did not observe any differences between the various particle compositions (Al_2O_3 vs ZrO_2 , and Al_2O_3 vs HDP) for equivalent size and concentrations.

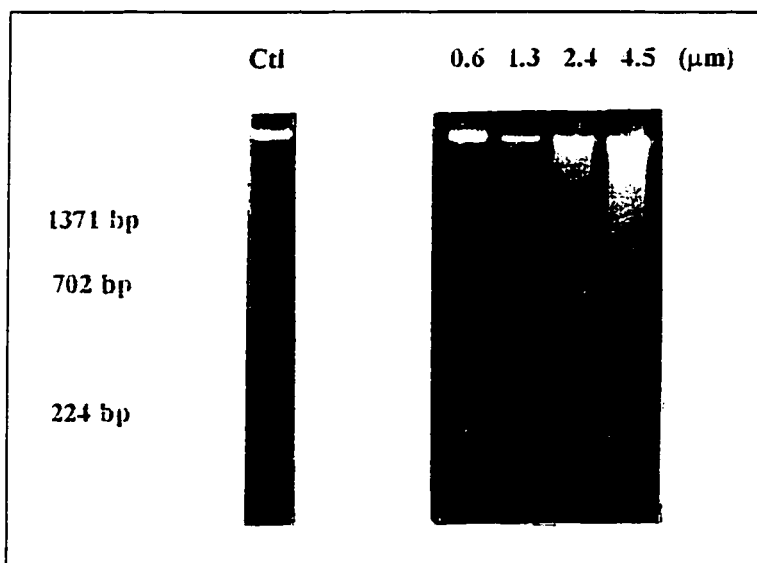


Figure 6.3. Effect of Al_2O_3 particle size on DNA laddering. J774 macrophages were incubated with Al_2O_3 particles at sizes varying from 0.6 μm to 4.5 μm at the concentration of 150 particles per macrophage (Results representative of 3 experiments).

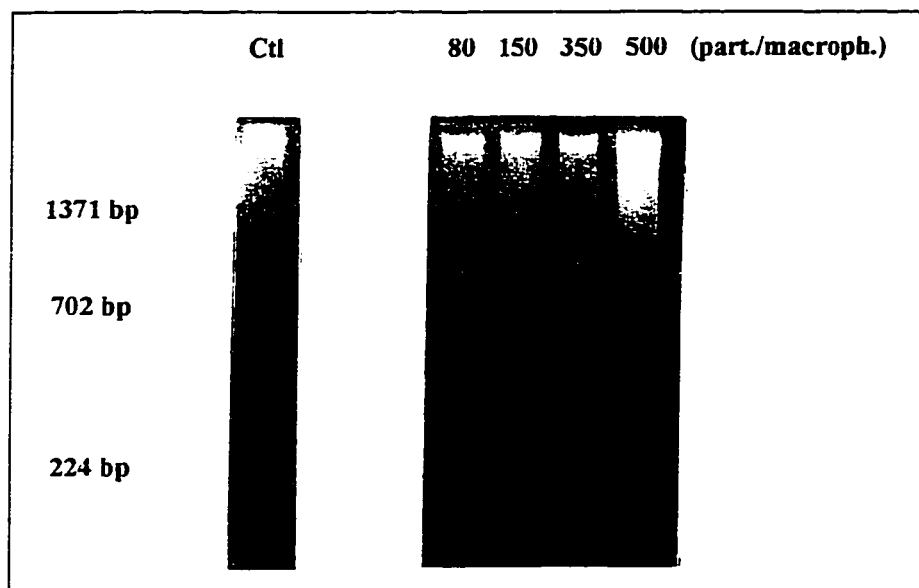


Figure 6.4. Effect of Al_2O_3 particle concentration on DNA laddering. J774 macrophages were incubated with Al_2O_3 particles at $1.3 \mu\text{m}$ and at concentrations varying from 5 to 500 particles per macrophage (Results representative of 3 experiments).

6.5 DISCUSSION

Using our *in vitro* macrophage culture model, we were able to induce apoptosis by cell stimulation with ceramic and HDP particles. The presence of apoptosis was confirmed using two complementary techniques, fluorescence microscopy and DNA analysis. Fluorescence microscopy has the advantage of visualizing cell morphology at the single cell level, and to observe the histologic features of apoptosis, namely nuclear condensation and cell shrinkage (22,24,35,36). However, for particles larger than 2.5

μm , it is difficult to view the cell because the large size of the particles obstruct and blur cellular morphology. It is for this reason that we were unable to compare HDP and Al_2O_3 at $4.5 \mu\text{m}$ by fluorescence microscopy. Nor did we have the opportunity to compare HDP and Al_2O_3 particles at sizes smaller than $4.5 \mu\text{m}$ due to the difficulty in obtaining a highly homogeneous sample of HDP. Therefore, to confirm our identification of apoptosis beyond the level of fluorescence microscopy, we used the technique of DNA analysis on agarose gels to detect the characteristic ladder pattern seen in apoptosis due to the orderly fragmentation of DNA into multiples of 180 base pair units. Our results of DNA ladder analysis correlated with those of our fluorescence microscopy and showed a high incidence of apoptosis, directly related to particle size and concentration, and independent of particle composition. These findings suggest that the two parameters that have an influence on induction of apoptosis are a combination of size and concentration, and that this most likely translates into a particle volume effect. In other words, to obtain the same percentage of apoptotic cells, we need a much higher concentration of small particles compared to larger particles.

Apoptosis is an active form of cell death that requires the cell's own participation in a series of organized events that will eventually lead to its demise. Apoptosis can be caused by various forms of exogenous and endogenous stimuli (24). In effect, the induction of cell death by any stimulus can take the form of necrosis or apoptosis, with apoptosis being the preferred route in cases of low dose stimulation. At high doses of

either endogenous or exogenous stimulus, cells are rapidly killed and do not have a chance to activate their internal suicide mechanism: they die by necrosis. Cell death by apoptosis is implicated in many disease forms, where the mechanisms involved include a deregulation of apoptosis resulting in a disruption in the homeostatic balance between cell proliferation and cell death (32). Therapeutic manipulation can be designed to specifically alter the balance between cell proliferation and cell death occurring in the foreign body granuloma surrounding loose prostheses. Indeed, many recent cancer therapies have as their aim to induce cell death by apoptosis (34). One of the highlights of apoptotic cell death as it applies to periprosthetic osteolysis, is that the whole process terminates in the elimination of dead cells without the induction of a significant inflammatory reaction. The latter is in contrast to necrosis, where the loss of membrane integrity leads to a non-specific release of the entire cellular contents into the extracellular environment thereby inducing an inflammatory response. Herein lies the interest in apoptosis as it applies to periprosthetic osteolysis.

Our *in vitro* cell culture results corroborate those of our *in vivo* analysis of pseudomembranes harvested at the time of revision surgery for osteolysis. More specifically, using TUNEL staining, DNA analysis and protein analysis, we have found that an average 31% of the cells in the periprosthetic granuloma are apoptotic (18). The identification of debris-induced apoptosis *in vivo* and *in vitro* makes it theoretically possible to manipulate this form of cell death in the periprosthetic environment. Indeed, many drugs and toxins have been shown to induce apoptosis (34). It has also been

demonstrated that the mechanisms of action of the biphosphonates are inhibition of osteoclast activity by induction of apoptosis (17). Furthermore, in a canine model of debris-induced osteolysis, a three-month treatment with oral biphosphonates inhibited the appearance of periprosthetic osteolysis compared to control animals that did not receive the drug (30). However, further studies are necessary to better understand the importance and the modulation of apoptosis in pseudomembrane macrophages.

Our analysis of the influence of particle size and concentration revealed that apoptosis increased with these two parameters. At first glance this would imply that as the toxic stimulus increases (in this case, wear particles), apoptosis also increases. The later is in contrast to the theory by Lennon *et al.*, who propose that as the toxic stimulus increases, cell death by necrosis occurs preferentially to apoptosis (24). However, it is very difficult to know, relative to *in vivo* concentrations, if our highest concentrations were in the range of toxic concentrations preferentially inducing necrosis or in the range of relatively low concentrations inducing apoptotic cell death. Because our results demonstrate that apoptosis gradually increases with particle size and concentration, we hypothesize that our particle concentrations were not toxic enough to induce necrosis in all our cells. This suggests that apoptosis occurs preferentially to necrosis up to a certain combination of size and concentration. In that range of parameters, specific treatments using biphosphonates, for example, may be designed to control apoptotic cell death and modulate periprosthetic osteolysis.

However, it is clear that the presence of apoptosis does not completely exclude necrosis even in cases of low dose stimulation. We feel that our results suggest that by increasing particle load, we are disrupting the balance between apoptosis and necrosis. Therefore, by increasing toxic particle load, the surrounding milieu is attempting to stifle the inflammatory response by increasing apoptotic cell death. The later can be seen as an internal attempt of cells at self-preservation in the face of increasing lethal doses of external stimulus. Quantification of the relative ratio of necrosis to apoptosis in our cell culture model have yet to be verified.

Lastly, the increasing appearance of apoptosis with increasing particle load is further supported by the direct correlation we found between particle size and concentration and TNF- α release (3). Numerous studies have shown a direct link between cytokine production, especially TNF- α , and the induction of apoptosis (5,13,21,38). TNF- α is an homotrimetric cytokine originally identified as an anti-cancer factor that can induce apoptosis due to its capacity to bond to membrane receptors expressed on most cells (27,31,34,37). In that case, apoptosis can be seen again as an internal attempt of cells at self-preservation in the face of increasing TNF- α due to an increasing lethal dose of external stimuli.

In conclusion, the constant bombardment of the periprosthetic cellular environment with particulate wear debris appears to be a complex interaction between chronic cellular stimulation which leads to the release of numerous cytokines, the induction of apoptosis

and necrosis, and finally osteolysis. Thus, future prosthetic design should focus on wear resistant interfaces to reduce wear debris and avoid the preferential induction of necrosis and high TNF- α release. By creating a low particle load periprosthetic environment, apoptosis would be favored. The superiority of the CC articulating interface in terms of wear resistance compared to the MPe joint couple merits continued study of this material for THAs and therapeutic manipulation of apoptosis should be investigated in the attempt to modulate periprosthetic osteolysis.

Acknowledgment: This study was supported by the Canadian Orthopaedic Foundation, the NSERC (National Sciences and Engineering Research Council of Canada) and the Canadian Government Award from the Department of Foreign Affairs and International Trade.

6.6 REFERENCES

1. Campbell P., Yeom. B., Mckellop, H., Schmalzried T., Amstutz, H.: Isolation of predominantly sub-micron UHMWPE wear particles from periprsothetic tissues. *J Biomed Mater Res* 29: 127-131, 1995
2. Catelas I., Huk O.L., Petit A., Marchand R., Yahia L'H.: Macrophage response to ceramic and polyethylene particles: Effects of size, concentration and composition. *J Biomed Mater Res (submitted)*

3. Catelas I., Huk O.L., Petit A., Marchand R., Yahia L.H.: Cytotoxicity and macrophage cytokine release induced by ceramic and polyethylene particles. *J Bone Joint Surg (submitted)*
4. Chiba J., Rubash H.E., Kim K.J., Iwaki Y.: The characterization of cytokines in the interface tissue obtained from failed cementless total hip arthroplasty with and without femoral osteolysis. *Clin Orthop Rel Res* 300:304-312, 1994
5. Dealtry G.B., Naylor M.S., Fiers W., Balkwill F.R.: DNA fragmentation and cytotoxicity caused by tumor necrosis factor is enhanced by interferon-g. *Eur J Immunol* 17:689-693, 1987
6. Eastman A.: Apoptosis: a product of programmed and unprogrammed cell death. *Toxicol Applied Pharmacol* 21:160-164, 1993
7. Glant T.T., Jacobs J.J., Molnar G., Shanbhag A.S., Valyon M., Galante M.O.: Bone resorption activity of particle-stimulated macrophages. *J Bone Miner Res* 8:1071-1079, 1993
8. Goldring S.R., Schiller A.L., Roelke M.S., Rourke C.M., O'Neil D.A., Harris W.H.: The synovial-like membrane at the bone-cement interface in loose total hip replacement and its proposed role in bone lysis. *J Bone Joint Surg [Am]* 65:575-584, 1983
9. Goodman S.B., Chin R.C., Chiou S.S., Schurman D.J., Woolson S.T., Masada M.P.: A clinical-pathological-biochemical study of the membrane surrounding loosened and nonloosened total hip arthroplasties. *Clin Orthop Rel Res* 244:182-187, 1989

10. Goodman S., Wang J.S., Regula D., Aspenberg P.: T-lymphocytes are not necessary for particulate polyethylene-induced macrophage recruitment: histologic studies of the rat tibia. *Acta Orthop Scand* 65: 157-160, 1994
11. Hermann M., Lorenz H.M., Voll R., Grünke M., Woith W., Kalden J.R.: A rapid method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Res* 22:5506-5507, 1994
12. Hernandez J.R., Keating E.M., Faris P.M., Meding J.B., Ritter M.A.: Polyethylene wear in uncemented acetabular components. *J Bone Joint Surg [Br]* 76:263-266, 1994
13. Hogquist K.A., Nett M.A., Unanue E.R., Chaplin D.D.: Interleukin 1 is processed and release during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 88:8485-8489, 1991
14. Horowitz S.M., Purdon M.A.: Mediator interactions in macrophage/particle bone resorption. *J Biomed Mat Res* 29:477-484, 1995
15. Howie D.W., Manthey B., Hay S., Vernon-Roberts B.: The synovial response to intraarticular injection of polyethylene wear particles. *Clin. Orthop* 292: 352-357, 1993
16. Howie D.W., Rogers S.D., Haynes D.R., Pearcy M.J.: The role of PE wear particles in inducing the release of mediators known to stimulate bone resorption. *Trans ORS* 40: 201, 1994
17. Hughes D.E., Wright K.R., Uy H.L., Sasaki A., Yoneda T., Roodman G.D., Mundy G.R., Boyce B.F.: Biphosphonates Promote Apoptosis in Murine Osteoclasts *In Vitro* and *In Vivo*. *J Bone Miner Research* 10: 1478-1487, 1995

18. Huk O.L., Petit A., Ralston W., Lisbona A., Zukor D.J.: Demonstration of apoptosis in pseudomembranes of failed total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg [Am]* (submitted)
19. Jasty M., Bragdon C., Jiranek W., Chandler H., Maloney W., Harris W.H.: Etiology of osteolysis around porous-coated cementless total hip arthroplasties. *Clin Orthop* 308: 111-126, 1994
20. Jiranek W.A., Machado M., Jasty M., Jevsevan D., Wolfe H., Goldring S.R., Goldberg M., Harris W.H.: Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. *J Bone Joint Surg [Am]* 75:863-879, 1993
21. Kaipa A., Sang-Young C., Eisenhauer K., Hsueh A.J.W.: Tumor necrosis factor- α and its second messenger, ceramide, stimulate apoptosis in cultured ovarian follicles. *Endocrinology* 137(11):4864-4870, 1996
22. Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-range implications in tissues kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257, 1972
23. Kim K.J., Rubash H.E., Wilson S.C., D'Antonio J.A., McClain. E.J.: A histologic and biochemical comparison of the interface tissues in cementless and cemented hip prostheses. *Clin Orthop Rel Res* 287 : 142-152, 1993
24. Lennon S.V., Martin S.J., Cotter T.G.: Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by a widely diverging stimuli. *Cell Prolif* 24:203-214, 1991
25. Lerouge S., Huk O., Yahia L'H., Sedel L.: Characterization of in vivo wear debris from ceramic-ceramic total hip arthroplasties. *J Biomed Mater Res* 32:627-633, 1996

26. Lerouge S., Huk O., Yahia L'H., Witvoet J., Sedel L.: Ceramic-ceramic vs metal-polyethylene: a comparison of periprosthetic tissue from loosened total hip arthroplasties. *J Bone Joint. Surg [Br]* 79:135-139, 1997
27. Medvedev A.E., Sundan, A., Espevik, T.: Involvement of the tumor necrosis factor receptor p75 in mediating cytotoxicity and gene regulating activities. *Eur J Immunol*, 24(11):2842-2849, 1994
28. Perry M.J., Ponsford F.M., Mortuza F.Y., Learmouth I.D., Atkins R.M., Elson C.J.: Osteolytic properties of the synovial-like tissue from aseptically failed joint prostheses. *Br J Rheum* 35:943-950, 1996
29. Santavirta S., Nordstrom D., Metsarinne K., Konttinen Y.T.: Biocompatibility of polyethylene and host response to loosening of cementless total hip replacement. *Clin Ortho* 297: 100-110, 1993
30. Shanbhag A.S., Hasselman C.T., Kovah C.J., Rubash H.E. Inhibition of osteolysis by biphosphonates in a canine total hip arthroplasty (THA) model, *Trans ORS* 43: 8, 1997
31. Sun D.Y., Jiang S., Zheng L.M., Ojcius O.M., Young J.D.E.: Separate metabolic pathways leading to DNA fragmentation and apoptotic chromatin condensation. *J Exp Med* 179:559-568, 1994
32. Thompson C.B.: Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science* 267:1456-1462, 1995

33. Thronhill T.S., Ozuna R.M., Shirtkroff S., Keller K., Sledge C.B., Spector M.:
Biochemical and histological evaluation of the synovial-like tissue around failed
(loose) total joint replacement prostheses in human subjects and a canine model.
Biomaterials 11:69-72, 1991
34. Uren A.G., Vaux D.L.: Molecular and clinical aspects of apoptosis. *Pharmacol Ther*
72:37-50, 1996
35. Wyllie A.H.: Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. In:
Cell death in biology and pathology, pp 9-34. Ed by I.D. Brown and R.A. Lockshin.
Chapman and Hall. London, 1981
36. Wyllie A.H., Morris R.G., Smith A.L., Dunlop D.: Chromatin cleavage in apoptosis:
association with condensed chromatin morphology and dependence on
macromolecular synthesis. *J Pathol* 142. 67-77, 1984
37. Zheng L., Fisher G., Miller R.E., Peschon J., Lynch D.H., Lenardo M.J.: Induction of
apoptosis in mature T cells by tumor necrosis factor. *Nature* 377(6547): 348-351,
1995
38. Zychlmsky A., Fitting C., Cavaillon J.M., Sansonetti P.J.: Interleukin 1 is release by
murine macrophages during apoptosis induced by *Shigella flexneri*. *J Clin Invest*
94:1328-1332, 1994

CHAPITRE 7: Discussion Générale

La présente étude a démontré que la taille et la concentration des particules étaient deux facteurs essentiels influençant la réponse des macrophages à des particules de céramiques et polyéthylène. La composition des céramiques ne semble jouer aucun rôle. Par contre, le polyéthylène (PE), quoique moins bien phagocyté *in vitro* que les céramiques, entraîne un relargage de TNF- α plus important que les céramiques. Enfin, nos résultats démontrent la présence d'apoptose dans nos cultures après incubation avec les différentes particules.

L'originalité première de ce projet repose sur l'étude de la réponse cellulaire des types de particules peu étudiés jusqu'à lors: les céramiques. En effet, même si quelques travaux ont déjà été réalisés sur l'alumine (Nakashima *et al.*, 1995), la majeure partie des études du même genre ont été réalisées sur des particules de métal (Blaine *et al.*, 1996; Goldring *et al.*, 1990, 1992; Gonzales *et al.*, 1995; Harada *et al.*, 1995; Howie *et al.*, 1992; Lalor *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996) de polyméthylméthacrylate (PMMA) (Algan *et al.*, 1996; Horowitz *et al.*, 1993), ou de PE (Harada *et al.*, 1994; Howie *et al.*, 1994), mais aucune étude à date n'a été réalisée sur la zircone, et la réaction cellulaire *in vitro* à des particules de céramique n'a jamais été comparée à celle en présence de particules de PE. D'autre part, ce projet innove par le développement d'un nouveau modèle pour

quantifier *in vitro* la phagocytose et la cytotoxicité par l'utilisation de la cytométrie en flux.

Alors qu'une étude antérieure réalisée dans notre laboratoire (Lerouge *et al.*, 1996, 1997) a tenté d'expliquer le phénomène de descellement par l'interprétation de la présence et du nombre de débris présents dans des pseudomembranes de prothèses de hanche descellées en métal-polyéthylène et céramique-céramique, nous avons tenté ici d'établir le rôle des différents paramètres relatifs aux particules (taille, concentration, composition) sur la réponse cellulaire dans un environnement contrôlé. Ceci nous a permis d'éliminer les facteurs confondants inhérents aux études *in vivo*. Par la corrélation de nos résultats de phagocytose, cytotoxicité, de médiateurs inflammatoires et d'apoptose, nous allons tenter de proposer différentes hypothèses sur le mécanisme de descellement des PTHs, et expliquer les ouvertures possibles sur un contrôle thérapeutique de l'ostéolyse périprothétique. Mais tout d'abord, nous aimerions discuter du choix de la technique relative à la cytométrie en flux (performances et limites).

7.1 LA CYTOMÉTRIE: PERFORMANCES ET LIMITES

L'évaluation de la réponse inflammatoire en fonction des différents paramètres particuliers n'a jamais été étudiée au niveau de la cellule. Une évaluation par microscopie (Murray *et al.*, 1990) a permis d'obtenir des informations qualitatives sur la phagocytose du latex et du zymosan par les macrophages. Les auteurs n'ont cependant

pas donné de commentaires sur le nombre de cellules analysées et n'ont pas quantifié les changements de morphologies observés. Nos résultats ont démontré que la cytométrie en flux est particulièrement bien adaptée à l'étude de la réponse des macrophages à des débris d'usure. En effet, ce qui distingue la cytométrie en flux de toutes les autres techniques est qu'elle réunit trois caractéristiques essentielles que sont l'analyse multiparamétrique cellule par cellule, la rapidité des acquisitions et la mesure quantitative d'un grand nombre de paramètres.

L'analyse multiparamétrique des cellules une à une permet notamment de trier, si nécessaire, les cellules parmi une population cellulaire hétérogène. La rapidité de l'appareil, associé à une informatique moderne permet d'analyser de manière fiable jusqu'à 10 000 événements par seconde. Dans notre étude, au moins 2 000 cellules étaient analysées à chaque test. Enfin, la cytométrie en flux permet de quantifier des observations qui ne sont que qualitatives au microscope. En effet, alors qu'il est difficile de classer des cellules en plus de quatre catégories selon leur fluorescence au microscope (les négatives, les faibles, les moyennes et les brillantes par exemple), le cytomètre, muni d'amplificateurs logarithmiques appropriés, peut au contraire quantifier rigoureusement chaque critère optique (diffusion de la lumière aux divers angles, fluorescences) sur une gamme allant de 1 à 10^4 pour un même réglage de l'appareil. La possibilité d'effectuer pour chaque cellule de telles mesures quantitatives sur plusieurs paramètres permet de réaliser une analyse statistique extrêmement complète.

Cependant, même si toutes les propriétés énoncées précédemment confèrent à la cytométrie en flux sa spécificité et sa puissance, elles lui imposent aussi ses limites. En effet, en ce qui concerne l'analyse multiparamétrique cellule par cellule, le principe même de l'analyse en flux repose sur le passage des cellules, une à une, devant le faisceau laser. Ceci exige donc par là-même qu'elles soient physiquement dissociées les unes des autres. L'utilisation d'une lignée cellulaire (donc de cellules isolées) ne pose théoriquement pas de problème. Cependant, la présence éventuelle de particules agglomérées pourraient interférer avec nos résultats. En effet, étant donné que nos particules ont toutes une taille inférieure à 5 μm , elles ne devraient donc pas être "vues" par le cytomètre dont les paramètres sont réglés pour ne détecter que les macrophages qui ont une taille de l'ordre de 15 à 20 μm . Pourtant, en s'agglomérant, les particules pourraient devenir d'une taille identique ou supérieure aux cellules. Elles seraient alors comptabilisées comme des cellules par le cytomètre, et fausseraient les résultats (surestimation de la phagocytose et sous-estimation de la cytotoxicité). Ce problème apparaît surtout pour les plus grosses particules (4.5 μm). En effet, à cette taille, une agglutination de seulement 4 particules atteint la même taille qu'une seule cellule et sera comptabilisée comme telle par le cytomètre. Afin d'éliminer cette éventualité, nous avons utilisé un anticorps fluorescent vert spécifique se fixant sur la membrane des macrophages (CD 45). De cette manière, nous avons ainsi identifié la population cellulaire dans notre fenêtre (R1) et calculé le pourcentage de particules éventuelles. Nous avons ainsi montré une présence massive de particules de 4.5 μm dans notre

fenêtre, ce qui nous a permis d'ajuster cette dernière afin d'obtenir un minimum de 20% de cellules dans celle-ci. En réalisant les tests sur 10 000 événements, nous étions ainsi assurés d'observer au minimum 2000 cellules. Ce problème est particulièrement important à fortes concentrations, et c'est pourquoi l'utilisation de la cytométrie en flux n'est pas très adaptée pour les particules de grosses tailles et à hautes concentrations. C'est la raison pour laquelle nous avons limité notre étude avec l'alumine à 4.5 μm à 150 particules par macrophage.

La deuxième limite d'utilisation de la cytométrie en flux dans le cadre de notre étude repose sur le fait que nos particules n'étaient pas fluorescentes. Nous n'avons donc pas pu déterminer le nombre de particules phagocytées par macrophage, mais seulement obtenir un indice de phagocytose et un indice de particules ingérées dans l'étude de la cinétique. Par ailleurs, ces deux indices ont été calculés à partir de fenêtres définies manuellement sur le graphe $\text{SSC}=\text{f}(\text{FSC})$. Dans le cas de l'indice de phagocytose par exemple, une fenêtre R2 permettait d'obtenir le pourcentage de macrophages ayant changé de taille/ et ou de morphologie après incubation avec les particules (cellules stimulées). Néanmoins, ce pourcentage excluait:

- les macrophages initialement présents dans la fenêtre et se retrouvant plus haut dans cette fenêtre après phagocytose,
- les macrophages ayant éclaté suite à une phagocytose trop importante de particules,
- les macrophages n'ayant pas assez phagocyté de particules pour se retrouver dans la fenêtre.

Aussi, parallèlement à l'analyse de phagocytose par cytométrie, il serait intéressant de pouvoir observer ce phénomène au microscope, avec une coupe histologique (détermination du nombre de particules dans chaque macrophage), ce qui compléterait l'étude, à moins de pouvoir rendre fluorescentes les particules étudiées.

Enfin, malgré la précision des interprétations quantitatives obtenues par cytométrie en flux, les données se présentant sous forme de chiffres très précis, d'histogrammes mono et bi-paramétriques, des erreurs et des imprécisions peuvent se cacher derrière ces chiffres. Pour un fluorochrome donné par exemple, le signal de fluorescence dépend de très nombreux facteurs dont la puissance de la source lumineuse, la longueur d'onde du laser, le gain des amplificateurs, la géométrie et la nature de l'optique, etc. Ainsi, une même molécule donnera des signaux très différents d'un appareil à l'autre. D'autre part, la relation entre le nombre de molécules cibles et de molécules fluorescentes qui les marquent est parfois difficile à contrôler. Dans notre étude par exemple, la quantité absolue d'iodure de propidium qui se lie à l'ADN d'une cellule dépend beaucoup de la méthode de fixation des cellules, des concentrations de marqueur, de la température et du pH. Cette relation quantitative entre cible et fluorochrome est encore plus difficile à établir pour les marquages immunofluorescents, comme dans le cas du marqueur CD45 que nous avons utilisé afin de distinguer les cellules des particules présentes. On conçoit donc l'importance de contrôles strictes afin d'obtenir une quantification fiables des cibles. On voit aussi combien il peut être difficile de comparer des résultats obtenus dans différents laboratoires qui utiliseraient des appareils différents, des réactifs ou anticorps

différents, ou encore des protocoles différents de marquage et lavage. Seules les tendances, et non les valeurs absolues, doivent alors retenir notre attention.

Quoiqu'il en soit, nos résultats démontrent clairement une phagocytose rapide des particules qui s'accompagne à long terme et pour des tailles et concentrations plus élevées d'une augmentation de mortalité cellulaire.

7.2 RÉSULTATS DE PHAGOCYTOSE, CYTOTOXICITÉ ET MÉDIATEURS INFLAMMATOIRES: LIEN AVEC LE MÉCANISME DE DESCELLEMENT DES PTHs

Les mécanismes par lesquels la présence de particules d'usure conduit à un recrutement cellulaire, à la résorption osseuse et finalement au descellement de la prothèse sont encore mal connus. Dans notre étude, nous avons tenté de comprendre la réponse d'un seul type des cellules impliquées dans la réaction inflammatoire: les macrophages. Ces cellules constituent 60 à 80% des cellules retrouvées dans les pseudomembranes, et elles y jouent donc un rôle prépondérant. Elles seraient en effet les premières cellules impliquées dès que des débris d'usure sont générés, et seraient donc à la base de la cascade de recrutement cellulaire, suivie de leur activation et du relargage de médiateurs inflammatoires conduisant à l'ostéolyse. Il s'agit alors ici des mécanismes biologiques du descellement aseptique. Pourtant, avant qu'il n'y ait un recrutement cellulaire, il faut une génération de débris, et ceci suppose donc que des facteurs mécaniques de

descellement interviennent initialement. A ce titre, Horowitz *et al.* (1995) ont démontré que le processus de recrutement cellulaire, et en particulier la présence de macrophages à l'interface os-implant, n'apparaît que si un ou des facteurs mécaniques conduisent à la génération de débris. Selon ces auteurs, les particules sont alors phagocytées par les macrophages qui sécrètent du TNF- α . Ce médiateur stimule les ostéoblastes avoisinants qui produisent du GM-CSF, de l'IL-6, et de la PGE₂, ce qui conduit à un recrutement de macrophages et ostéoclastes dans la région de l'interface os-ciment et entraîne une amplification du mécanisme conduisant à la résorption osseuse puis ultimement au descellement aseptique de la prothèse. Nos résultats sont en accord avec cette étude. Nous avons en effet montré une augmentation du nombre de macrophages stimulés (indice de phagocytose) et de la mortalité avec le nombre et la taille des débris, ainsi qu'une augmentation de sécrétion de TNF- α . La génération de débris par des facteurs mécaniques semble donc être la clef des problèmes de descellement aseptique. Une étude de Aspenberg (1996) a en effet montré que la membrane fibreuse à l'interface os-implant apparaissait suite à la génération de micromouvements à cette interface provoqués par un manque de stabilité mécanique, mais que cette membrane ne persistait qu'en présence de débris. Ainsi, si le mouvement cessait et qu'il n'y avait pas de débris à l'interface, le contact os-implant était rétabli. Bechtold *et al.* (1995) ont aussi montré que le mouvement seul n'était pas suffisant pour entraîner une réaction inflammatoire et que le tissu fibreux apparaissant à l'interface os-implant ne contenait pas de cellules immunitaires. Il est à noter qu'il s'agit cependant de modèles réalisés à partir d'études de

quelques semaines seulement (6 dans l'étude de Aspenberg et 8 dans l'étude de Bechtold), et que les particules utilisées étaient des particules de PE (identiques à celles que nous avons utilisées) d'une taille de 4.7 μm en moyenne, ce qui reste un peu élevé par rapport à la taille des particules retrouvées *in vivo*. Néanmoins, ces études montrent que les facteurs mécaniques seraient de première importance dans le phénomène de descellement aseptique mais ne seraient pas suffisants, et que les particules moduleraient les étapes suivantes du processus d'ostéolyse.

Dans le cas des prothèses CC, les facteurs mécaniques de descellement sont essentiellement liés aux propriétés mécaniques de l'alumine. En effet, le module d'élasticité de ce matériau est très élevé par rapport à celui de l'os, entraînant une augmentation des contraintes de cisaillement à l'interface, se traduisant biologiquement par l'apparition d'une couche fibreuse. D'autre part, la faible capacité d'amortissement de ce matériau entraîne des risques de microfractures osseuses dans le cas de prothèses non cimentées, ou de microfractures du ciment de fixation par fatigue dans le cas de prothèses cimentées. Par ailleurs, les prothèses cimentées risquent de générer plus de débris d'usure (débris de ciment), et ainsi d'accroître la réaction inflammatoire. C'est d'ailleurs ce qui a été démontré par Lerouge *et al.* (1996, 1997). Cette étude a montré une réaction inflammatoire importante dans le cas de prothèses CC cimentées, identique à celle observée avec des prothèses MPe (pour lesquelles nous avons beaucoup de débris PE), mais une réaction moins forte autour des prothèse CC non cimentées (moins de débris). Les auteurs avaient alors émis l'hypothèse que le descellement aseptique des

cupules non cimentées était plutôt induit par facteurs mécaniques (car les débris étaient présents en moins grande quantité). En ce qui concerne les cupules cimentées, l'importance relative des facteurs mécaniques et des débris de zircone retrouvés (marqueur radioopacifiant du ciment de fixation) n'avait pas été éclairci. À la lumière des études prospectives exposées précédemment, nous pouvons supposer que dans chaque cas, les facteurs mécaniques jouent un rôle initiateur, mais que la réponse inflammatoire entraînant à plus long terme l'ostéolyse et le descellement de la prothèse est modulé par la présence plus ou moins importante des débris d'usure. Ainsi, si l'on a peu de débris, on aura une faible réaction donc moins de descellement. Par contre, si les débris sont présents en forte concentration, le recrutement cellulaire sera massif et entraînera l'ostéolyse selon les étapes énoncées antérieurement (Horowitz *et al.*, 1995). C'est aussi ce que suggèrent nos résultats qui démontrent une augmentation du nombre de macrophages stimulés (indice de phagocytose), de la mortalité et de la sécrétion de médiateurs inflammatoire avec la taille et la concentration des particules. Schmalzried *et al.* (1992) avaient également démontré que la concentration locale en particules déterminait le degré de réponse inflammatoire et le degré de résorption osseuse. Concernant l'effet de taille, il est probable que plus les débris sont gros et en grande quantité, plus ils sont vus facilement par les macrophages, ce qui entraîne une augmentation du pourcentage de macrophages stimulés, donc une augmentation de sécrétion de TNF- α . Ceci explique le plateau obtenu pour l'indice de phagocytose, indépendamment de la taille et la concentration des particules. L'augmentation de

mortalité observée parallèlement peut s'expliquer par un effet de volume particulaire. En supposant que les particules étaient sphériques, on peut par exemple calculer le rapport des volumes de deux particules de 2.4 et 1.3 μm . Ce rapport montre qu'une particule de 2.4 μm occupe un volume environ 6.3 plus important qu'une particule de 1.3 μm . Ainsi, en théorie, il serait nécessaire d'avoir 6.3 fois plus de particules de 1.3 μm que de particules de 2.4 μm pour obtenir le même volume particulaire, et ainsi la même réponse cellulaire donc le même taux de mortalité. Même s'il serait exagéré de parler en chiffres absolus, nos résultats ont tout de même montré que pour obtenir un pourcentage donné de mortalité, il faut effectivement beaucoup plus de particules de petites tailles par rapport aux particules de grosses tailles (pour obtenir environ 5% de mortalité, il était nécessaire d'avoir une concentration de 500 particules par macrophage à 1.3 μm contre une concentration de 100 à 150 particules par macrophage à 2.4 μm (Figure 4.6)). D'autre part, il est probable que les grosses particules soient plus endommageantes, donc plus nocives que les petites particules.

Concernant l'effet de composition, nos résultats suggèrent qu'en terme de réaction inflammatoire, il semble indifférent d'utiliser l'alumine ou la zircone. Par contre, aux mêmes tailles et concentrations, l'alumine entraîne moins de sécrétion de $\text{TNF-}\alpha$ que le PE. Ceci démontre un avantage à l'utilisation du couple CC par rapport au couple MPe, d'autant plus que le couple CC présente une meilleure résistance à l'usure. Par contre, les céramiques présentent des caractéristiques mécaniques (module d'élasticité et propriété

d'amortissement) moins bonnes que le PE. Aussi, il serait intéressant de se pencher sur l'étude de l'utilisation de cupules céramiques non cimentées pour éviter les débris de ciment qui entraîne une réaction inflammatoire importante, en trouvant un système de fixation qui permette de réduire les problèmes de contraintes de cisaillement et le manque d'amortissement à l'interface os-céramique.

7.3 LES CYTOKINES: MARQUEURS DE L'ACTIVITÉ DES MACROPHAGES

La principale réponse des macrophages à un stimulus externe est la production et la sécrétion de cytokines. Il a été démontré *in vivo* que le TNF- α et l'IL-1 α et β pouvaient induire l'ostéolyse (Chiba *et al.*, 1994, Shanbhag *et al.*, 1995). L'analyse de l'induction de la sécrétion de ces cytokines en réponse aux particules de céramique et de PE est donc essentielle à la compréhension des phénomènes cellulaires reliés au descellement aseptique.

Nos résultats démontrent une augmentation de la sécrétion de TNF- α avec la taille et la concentration des particules. Ces résultats montrent que la sécrétion de TNF- α peut être utilisée comme marqueur de la réponse *in vitro* des macrophages aux particules de céramiques et de PE.

D'autre part, nous n'avons pas détecté de sécrétion d'IL-1 α et β par les macrophages aux concentrations de particules étudiées. Pourtant, des études *in vivo* ont détecté de

l'IL-1 dans des pseudomembranes de PTHs ayant échouées (Chiba *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1994). La différence entre ces résultats obtenus *in vivo* et nos résultats *in vitro* suggèrent que les IL-1 pourraient être produites par des cellules autres que les macrophages. Notons tout de même que lors d'une étude utilisant aussi des particules de céramique, Nakashima *et al.* (1995) avaient détecté un taux significatif de IL-1 α *in vitro*. La différence entre nos résultats et ceux de cette étude peut s'expliquer par une différence de taille de particules. En effet, l'étude de Nakashima *et al.* (1995) utilisait des particules de céramique de 1, 100 et 1000 μm , tailles nettement supérieures à celles des particules retrouvées *in vivo*. Nos résultats démontrent donc que IL-1 α et β ne sont pas des marqueurs de la réponse *in vitro* des macrophages aux particules de céramique et de PE. Leur utilisation comme marqueur de la réponse des macrophages à d'autres biomatériaux reste cependant à étudier.

7.4 L'APOPTOSE: UN MOYEN DE TRAITEMENT THÉRAPEUTIQUE DE L'OSTÉOLYSE PÉRIPROSTHÉTIQUE?

Comme nous l'avons vu au chapitre 1, l'apoptose est un processus de mortalité cellulaire qui met en jeu une série d'événements organisés requérant la participation active de la cellule. Ce type de mortalité peut être causé par divers stimuli exogènes et endogènes (Lennon *et al.*, 1991). En fait, la mortalité cellulaire induite par divers agents peut prendre la forme de nécrose ou d'apoptose, l'apoptose apparaissant plutôt lorsque les

divers agents "toxiques" seraient à trop faible dose pour provoquer la mort cellulaire directe. A forte dose, les cellules seraient tuées rapidement, et n'activeraient aucun mécanisme interne de programmation de suicide: elles mouraient alors par nécrose.

La mort cellulaire par apoptose est en fait impliquée dans un grand nombre de maladies, provoquées entre autre par un dérèglement de ce type de mortalité. En effet, dans des organismes multicellulaires, l'homéostasie est maintenue par une balance entre la prolifération et la mortalité cellulaire (Thompson *et al.*, 1995). C'est pourquoi des traitements désignés pour altérer spécifiquement le mécanisme apoptotique peuvent avoir le potentiel de changer la progression naturelle de certaines maladies ou dégénérescences telle que possiblement l'ostéolyse périprothétique. Il s'agit alors de manipuler l'apoptose dans un but thérapeutique. Ainsi par exemple, beaucoup de thérapies contre le cancer agissent par induction de suicide cellulaire (Uren *et al.*, 1996). Rappelons qu'une caractéristique importante de l'apoptose est qu'il en résulte l'élimination des cellules mourantes sans induire de réponse inflammatoire importante. Au contraire, la mort par nécrose est associée à une perte de l'intégrité de la membrane cellulaire, résultant en un déversement non spécifique du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire et induisant alors une réponse inflammatoire majeure. En effet, même si les médiateurs protéiques tels que les interleukines et le TNF- α n'ont pas eu le temps d'être synthétisés par les cellules nécrotiques, tous les médiateurs lipidiques tels que les leukotriènes et les prostaglandines présentes dans toutes les cellules se trouvent à être relarguées non spécifiquement lors de l'altération membranaire des cellules

nécrotiques. Dans le cas de l'ostéolyse périprothétique, il pourrait donc être préférable, s'il doit y avoir mort de cellules, de favoriser la mortalité apoptotique à la mortalité nécrotique dans les pseudomembranes.

Nos résultats démontrent que les débris de céramique et de PE peuvent induire de l'apoptose dans nos cultures. Ces résultats sont en accord avec ce qui est retrouvé *in vivo* où les cellules des pseudomembranes entourant les prothèses descellées, principalement des macrophages, montrent également un taux de mortalité apoptotique (environ 31%) (Huk *et al.*, 1997). Il pourrait donc être possible de contrôler en partie la réponse cellulaire induite par les débris d'usure générés par les prothèses. L'analyse de l'influence de la taille et la concentration des particules a démontré que l'apoptose augmentait avec ces deux paramètres. Ceci signifierait que l'apoptose serait d'autant plus importante que les facteurs externes la provoquant (en l'occurrence ici les particules) seraient présents à forte dose. Ceci est contraire à la théorie de Lennon *et al.* (1991), ayant montré que les cellules soumises à divers agents à forte dose sont tuées directement de manière nécrotique. Cependant, nous ne pouvons pas savoir si les concentrations utilisées dans cette étude sont reconnues comme étant faibles ou fortes par les macrophages. Aucune étude *in vivo* n'a quantifié les concentrations de particules présentes par macrophage. Comme l'apoptose apparaît graduellement avec les tailles et concentrations utilisées, nos résultats suggèrent que les plus hautes concentrations utilisées ne sont pas reconnues comme très toxiques par les macrophages. On pourrait alors imaginer que jusqu'à une certaine concentration, l'apoptose surviendrait préférentiellement à la nécrose, sans

toutefois l'exclure totalement. L'augmentation de cytokines telles que $\text{TNF-}\alpha$ proviendrait essentiellement des autres cellules, ni nécrotiques ni apoptotiques, mais vivantes et stimulées par les particules. Dans ce cas, il suffirait de réduire le nombre de débris en choisissant des matériaux résistants à l'usure afin d'éviter l'apparition de la nécrose, et choisir un traitement thérapeutique pour contrôler la mortalité apoptotique. Le couple CC serait un bon choix pour réduire le nombre de débris d'usure, et un traitement aux biphosphonates, connus pour diminuer la résorption osseuse (Pandey *et al.*, 1996), pourrait aussi être envisagé. En effet, il a été démontré récemment que leur activité pouvait être reliée à l'induction de l'apoptose dans les ostéoclastes (Hughes *et al.*, 1995), un des principaux constituants de l'activité ostéolytique. Utilisant un modèle canin dans lequel l'ostéolyse était induite par des débris, Shanbhag *et al.* (1997) ont montré une inhibition de l'ostéolyse périprothétique après trois mois de traitement oral à base de biphosphonates, en comparaison au groupe contrôle n'ayant pas reçu le traitement. D'autres travaux sont cependant nécessaires pour comprendre l'importance et la modulation de l'apoptose dans les macrophages des pseudomembranes, et la répercussion des différents traitements envisagés sur les cellules osseuses.

Cependant, la présence d'apoptose n'exclut pas complètement la nécrose, même dans le cas de faibles concentrations en particules. Nos résultats suggèrent qu'en augmentant le nombre de particules, il est probable que la balance entre l'apoptose et la nécrose soit renversée. Ainsi, en augmentant les concentrations en particules, les cellules environnantes tentent de lutter contre une augmentation de réponse inflammatoire en

mourant par apoptose. Ainsi, ce phénomène pourrait être vu comme une stratégie interne des cellules visant à se protéger face à une augmentation des doses léthales du stimulus externe. Il resterait donc maintenant à quantifier la présence de nécrose et apoptose dans nos cultures.

Enfin, l'augmentation d'apoptose pourrait aussi être interprétée comme un événement faisant suite à la sécrétion de TNF- α par le reste des cellules vivantes, en particulier si les concentrations utilisées sont vues comme fortes (donc très toxiques) par les macrophages. Dans ce cas, il est probable que l'on ait la présence d'une mortalité nécrotique assez importante. En augmentant les concentrations des particules, on se trouve à augmenter le nombre de cellules stimulées, et donc augmenter la quantité de TNF- α sécrété. De nombreuses études ont démontré un lien entre la production de cytokines et l'apoptose (Dealtry *et al.*, 1987; Hogquist *et al.*, 1991; Zychlmsky *et al.*, 1994), spécialement avec TNF- α . Ce lien peut s'expliquer par la présence de récepteurs de surface membranaires. En fait, TNF- α est une cytokine homotrimérique originalement identifiée comme un facteur anticancéreux pouvant induire l'apoptose grâce à sa capacité à se lier à des récepteurs membranaires exprimés par la plupart des cellules (Hsu *et al.*, 1995; Medvedev *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 1995; Uren *et al.*, 1996; Zheng, L., 1995). Ceci pourrait expliquer la corrélation que nous avons trouvée entre le taux de TNF- α et le taux d'apoptose. Il serait alors nécessaire de réduire le nombre de débris d'usure afin d'éviter une forte stimulation des cellules entraînant une sécrétion

importante de médiateurs inflammatoires tels que le $\text{TNF-}\alpha$, agissant sur l'ostéolyse. En ce sens, le couple CC paraît là encore être une bonne alternative.

Notons que si les concentrations en particules devenaient trop fortes, les cellules mourraient de manière nécrotique. Ainsi, dans le cas du couple MPe qui génère beaucoup de débris d'usure, il serait peut-être bon d'envisager un traitement thérapeutique préventif visant à induire l'apoptose avant que les cellules ne meurent de manière nécrotique. Mais l'interprétation des résultats (nécrose/apoptose) reste à vérifier en quantifiant la présence de mortalité nécrotique.

Conclusion et perspectives

Cette étude nous a permis de pouvoir comparer la réaction des macrophages à différents types de particules, particulièrement de céramiques qui, jusqu'à lors, avaient été très peu étudiées. La mise au point de notre modèle *in vitro* nous a permis de retracer l'ensemble de la réaction des macrophages aux différentes particules et l'utilisation de la cytométrie en flux pour l'analyse de la phagocytose et la cytotoxicité des particules pourrait être généralisée à l'étude de la réaction cellulaire à des particules de n'importe quel biomatériau. L'émergence de nouvelles méthodes de mesure de l'apoptose et de la nécrose par cytométrie en flux permet de penser que les performances de notre modèle pourraient être encore améliorées dans un avenir proche, avec notamment des mesures quantitatives de ces deux types de mortalité.

Par l'analyse de l'effet des différents paramètres cellulaires, nous avons pu mettre en évidence l'importance de l'influence de la taille et la concentration des particules, qui suggère un effet de volume particulaire. L'analyse de l'effet de composition n'a pas montré de différence significative entre Al_2O_3 and ZrO_2 , ce qui démontre que, en terme de réaction inflammatoire, il serait indifférent d'utiliser l'un ou l'autre de ces matériaux. Par contre, nous avons montré que le polyéthylène, bien que moins facilement phagocytable *in vitro*, entraîne une sécrétion plus importante de $\text{TNF-}\alpha$ que l'alumine

aux mêmes tailles et concentrations. Ceci démontre que même si l'alumine n'est pas complètement bioinerte et peut aussi engendrer une réaction inflammatoire à l'état particulaire, elle demeure supérieure au polyéthylène en terme de biocompatibilité.

Enfin, la présence d'apoptose dans nos cultures cellulaires ouvre des portes vers le traitement thérapeutique de l'ostéolyse périprothétique par modulation des événements cellulaires conduisant à la résorption osseuse.

Suite à ce travail, d'autres études peuvent être envisagées, autant au niveau biologique qu'au niveau mécanique. En effet, alors que cette étude nous a permis de comprendre la réaction d'un type de cellules particulier (les macrophages), il serait maintenant intéressant d'envisager une étude similaire avec un modèle de coculture *in vitro* utilisant des cellules osseuses. La coculture de macrophages et d'ostéoblastes ou d'ostéoclastes permettrait de mieux simuler l'environnement autour des prothèses descellées et ainsi étudier l'interaction de ces différentes populations cellulaires sur la résorption osseuse. Une telle étude compléterait notre compréhension du phénomène d'ostéolyse périprothétique et permettrait aussi d'essayer de moduler la mortalité par apoptose sur les cellules osseuses elles-mêmes en étudiant l'effet de différents traitements thérapeutiques.

En terme d'ouverture vers des études biomécaniques, notre projet montre toute l'importance d'améliorer la méthode de fixation des prothèses CC, dont la rigidité très supérieure à celle de l'os pose des problèmes mécaniques à l'interface os-implant. En

effet, alors que notre étude montre l'avantage de l'utilisation de la céramique en terme de réaction inflammatoire, il n'empêche que son utilisation reste limitée à cause de problèmes mécaniques.

Références

1. AGATHOPOULOS, S., et NIKOLOPOULOS P. (1995). Wettability and interfacial interactions in bioceramic-body-liquid systems. J. Biomed. Mater. Res., 29, 421-429.
2. ALGAN, S.M., PURDON, M., et HOROWITZ S.M. (1996). Role of tumor necrosis factor alpha in particulate-induced bone resorption. J. Orthop. Res., 14(1), 30-35.
3. ASPENBERG, P., et HERBERTSSON, P. (1996). Periprosthetic Bone Resorption. J. Bone Joint Surg., 78B, 641-646.
4. BECHTOLD, J.E., SOBALLE, K., LEWIS, J.L., et GUSTILO, R.B. (1995). The roles of implant motion and particulate polyethylene debris in the formation of an aggressive periprosthetic membrane. Trans ORS, 41, 767.
5. BENZ, E.B., FEDERMAN, M., GODLESKI, J.J., BIERBAUM, B.E., THORNHILL, T.S., SLEDGE, C.B., et SPECTOR, M. (1994). Ultrastructure of cells that have phagocytosed PE particles in peri-implant tissu from revision artroplasty. Trans ORS, 40, 200.

6. BENNETT, N.E., WANG, J.T., MANNING, C.A., et GOLDRING, S.R. (1991). Activation of Human Monocyte- Macrophages and fibroblasts by metal particles; release of products with bone resorbing activities. Trans ORS, 37, 188.
7. BLAINE, T.A., ROSIER R.N., PUZAS J.E., LOONEY R.J., REYNOLDS P.R., REYNOLDS S.D., et O'KEEFE R.J. (1996). Increased Levels of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-6 Protein and Messenger RNA in Human Peripheral Blood Monocytes due to Titanium Particles. J. Bone Joint Surg., 78A, 1181-1191.
8. BOUTIN, P. (1972). Arthroplastie totale de hanche par prothèse en alumine frittée. Rev. Chir. Orthop., 58, 229-246.
9. BOUTIN, P. et BLANQUAERT, D. (1981). Le frottement Al-Al en chirurgie de la hanche: 1205 arthroplasties totales. Rev. Chir. Orthop., 67, 279-287.
10. BOUTIN, P., CHRISTEL, P., DORLOT, J.M., MEUNIER, A., DE ROQUANCOURT, A., BLANQUAERT, D., HERMANN, S., SEDEL, L., et WITWOET, J. (1988). The use of dense alumina-alumina ceramic combination in THR. J. Biomed. Mater. Res., 22, 1203-1232.
11. CAMPBELL, P., YEOM, B., MCLELLOP, H., SCHMALZRIED, T. et AMSTUTZ, H. (1995). Isolation of predominantly sub-micron UHMWPE wear particles from periprosthetic tissues. J. Biomed. Mater. Res., 29, 127-131.

12. CATELAS, I. (1995). Étude de la réponse *in vitro* de macrophages à des particules d'usure provenant de matériaux utilisés dans les Prothèses Totales de Hanche. Projet de fin d'études, Université de Technologie de Compiègne, France, et École Polytechnique de Montréal, Québec, Canada.
13. CATELAS, I., HUK, O.L., MARCHAND, R., et YAHIA, L'H. (1996). Cytotoxicity of ceramics compared to polyethylene by flow cytometry. Bioceramics, 9, 93-96.
14. CHARNLEY, J. (1972). The long-term results of low-friction arthroplasty of the hip performed as a primary intervention. J. Bone Joint Surg., 54B, 61-76.
15. CHIBA, J., MALONEY, W., HORIKOSHI, M., MCINTYRE, L., et RUBASH, H. (1993) Biochemical and morphological analyses of activated human macrophages and fibroblasts by human polyethylene particles Trans ORS, 39, 270.
16. CHIBA, J., RUBASH, H.E., KIM, K.J.K., et IWAKI, Y. (1994). The characterization of cytokines in the interface tissue obtained from failed cementless Total hip artroplasty with and without femoral osteolysis. Clin. Orthop. Relat. Res., 300, 304-312.
17. CHIBA J., INOUE K., RUBASH H., et BOOTH R. (1994). Biochemical and immonohistochemical characteristics of interface membranes in failed cementless

- hip and knee prostheses that exhibit radiographic evidence of osteolysis, Trans ORS, 40, 153.
18. CHRISTEL, P., DORLOT, J.M., et MEUNIER, A. (1989). On the specifications for the use of bioinert ceramics in THR. Bioceramics 1. H. Oonishi, H. Aoki, Y. Sawai, Proceedings of the 1st International Symposium on Ceramics in Medicine, Kyoto, Japan, 266-271.
 19. CHRISTEL, P. (1992). Biocompatibility of surgical-grade dense polycrystalline alumina. Clin. Orthop. Rel. Res., 282, 10-18.
 20. COHEN, J.J. (1993). Apoptosis. Immunol. Today, 14(3), 126-130.
 21. DEALTRY, G.B., NAYLOR, M.S., FIERS, W., et BALKWILL, F.R. (1987). DNA fragmentation and cytotoxicity caused by tumor necrosis factor is enhanced by interferon- γ . Eur. J. Immunol., 17, 689-693.
 22. DORLOT, J.M., CHRISTEL, P., et MEUNIER, A. (1989). Wear analysis of retrieved alumina heads and sockets of hip prostheses. J. Biomed. Mater. Res., 23, 299-310.
 23. EASTMAN A. (1993). Apoptosis: A product of programmed and unprogrammed cell death. Toxicol. Appl. Pharmacol., 121, 160-164.

24. GLANT, T.T., JACOBS, J.J., MOLNAR, G., SHANBHAG, A.S., VAYON, M., et GALANTE J.O. (1993). Bone Resorption Activity of Particulate-Stimulated Macrophages. J. Bone Miner. Res., 8(9), 1071-1079.

25. GLANT, T.T., et JACOBS, J.J. (1994). Response of the three murine macrophage populations to particulate debris: bone resorption in organ cultures. J. Orthop. Res., 12(5), 720-731.

26. GOLDRING, S.R., SCHILLER, A., ROEKLE, M., ROURKE, C.M., O'NEIL, D.A. et HARRIS, W.H. (1983). The synovial-like membrane at the bone-cement Interface in loose total hip replacements and its proposed role in bone lysis. J. Bone Joint Surg., 65A, 575-573.

27. GOLDRING, S.R., KROOP, S.F., PETRISON, K.K., MANNING, C.A., FLANNERY, M.S., et JASTY, M.J. (1990). Metal Particles Stimulate Prostaglandin E2(PGE2) Release and collagen Synthesis in Cultured Cells. Trans ORS, 36, 444.

28. GOLDRING, S.R., BENNETT, N.E., JASTY, M.J., et WANG, J.T. (1992). *In Vitro* Activation of Monocyte Macrophages and Fibroblasts by Metal Particles. Particulate Debris from Medical implants, Mechanisms of Formation and Biological Consequences, Kenneth R St John, 137-142.

29. GONZALES, J.B., et HOROWITZ, S.M. (1995). Response of macrophages and osteoblasts to titanium. Trans SFB, 21, 407.
30. GONZALES, O., SMITH, R.L. et GOODMAN, S.B. (1995). Effects of PMMA particles of varying sizes and concentrations on human macrophages in vitro. Trans ORS, 41, 167.
31. GOODMAN, S.B., CHIN, R.C., CHIOU, S.S., SCHURMAN, D.J., WOOLSON, S.T. et MASADA, M.P. (1989). A clinical-pathologic-biochemical study of the membrane surrounding loosened and nonloosened THA. Clin. Orthop., 244, 182-187.
32. GRELSAMER, R.P., HEIMKE, G., et BERG, E. (1991). Correspondence. J. Bone Joint Surg., 73A, 1112.
33. HARADA, Y., DOPPALAPUDI, V.A., WILLIS, A.A., JASTY, M., HARRIS, W.H., et GOLDRING, S.R. (1994). Human Macrophage Response To Polyethylene Particles in Vitro, A New Experimental Model. Trans ORS, 40, 842.
34. HARADA, Y., DOPPALAPUDI, V.A., WILLIS, A.A., JASTY, M., HARRIS, W.H., et GOLDRING, S.R. (1994). Novel model for assessing cell responses to PE particles. AMSFB, 20, 390.
35. HARADA, Y., BROWN, S., MERRITT, K., WANG, J.T., DOPPALAPUDI, V.A., WILLIS, A.A., JASTY, M., HARRIS, W.H., et GOLDRING, S.R. (1995). Effects of

metal particles and their corrosion products on human monocyte-macrophages in vitro. Trans ORS, 41, 776.

36. HARMS, J., et MÄUSLE E. (1979). Tissue Reaction to Ceramic Implant Material. J. Biomed. Mater. Res., 13, 67-87.

37. HAYNES, D., ROGERS, S., HAY, S., PEARCY, M., et HOWIE, D. (1993). The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium-alloy wear particles. J. Bone Joint Surg., 75A, 825-834.

38. HOGQUIST, K.A., NETT, M.A., UNANUE, E.R., et CHAPLIN, D.D. (1991). Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 88, 8485-8489.

39. HORIKOSHI, M., DOWD, J., MALONEY, W., CROSSETT, L., et RUBASH, H. (1994). Activation of human fibroblasts and macrophages by particulate wear debris from failed total hip and total knee arthroplasty, Trans ORS, 40, 199.

40. HOROWITZ, S.M., FRONDOZA, C.G., et LENNOX, D.W. (1988). Effects of Polymethylmethacrylate Exposure upon Macrophages J. Orthop. Res, 6(6), 827-832.

41. HOROWITZ, S.M., GAUTSCH, T.L., FRONDOZA, C.G., et RILEY, L.JR.. (1991). Macrophage exposure to polymethyl methacrylate leads to mediator release and injury. J. Orthop. Res., 9(3), 406-13.

42. HOROWITZ, S.M., DOTY, S.B., LANE, J.M., et BURSTEIN, A.H. (1993). Studies of the mechanism by which the mechanical failure of polymethylmethacrylate leads to bone resorption. J. Bone Joint Surg., 75A, 802-13.
43. HOROWITZ, S.M., et PURDON, M.A., (1994). PMMA Particulate Osteolysis Occurs Via a Prostaglandin E2 Dependent Mechanism, Trans ORS, 40, 851.
44. HOROWITZ, S.M., RAPUANO, B.P., LANE, J.M., et BURSTEIN, A.H. (1994). The interaction of the macrophage and the osteoblast in the pathophysiology of aseptic loosening of joint replacements. Calcif. Tissue Int., 54(4), 320-4.
45. HOROWITZ SM. (1995). Mechanisms of cellular recruitment in aseptic loosening of prosthetic joint implants. Calcif. Tissue Int., 57, 301-305.
46. HOROWITZ, S.M., et PURDON, M.A. (1995). Mediator interactions in macrophage/particulate bone resorption. J. Biomed. Mater. Res., 29(4), 477- 84.
47. HOROWITZ, S.M, et GONZALES, J.B. (1996). Inflammatory response to implant particulates in a macrophage/osteoblast coculture model. Calcif. Tissue Int., 59(5), 392-396.
48. HOWIE, D.W., HAYNES, D.R., HAY, S., ROGERS, S.D., et PEARCY, M.J. (1992). The effect of titanium alloy and cobalt chrome wear particles on production

of inflammatory mediators IL-1, TNF, IL-6 and prostaglandin E2 by rodent macrophages *in vitro*. Trans ORS, 38, 344.

49. HOWIE, D.W., ROGERS, S.D., HAYNES, D.R., et PEARCY, M.J. (1994). The role of PE wear particles in inducing the release of mediators known to stimulate bone resorption. Trans ORS, 40, 201.
50. HSU, H., XIONG, J., et GOEDDEL, D.V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. Cell, 81(4), 495-504.
51. HUGHES, D.E., WRIGHT K .R., UY, H.L., SASAKI, A., YONEDA T., ROODMAN G.D., MUNDY, G.R., et BOYCE, B.F. (1995). Biphosphonates Promote Apoptosis in Murine Osteoclasts *In Vitro* and *In Vivo*. J. Bone Miner. Res., 10, 1478-1487.
52. HUK, O.L., BANSAL, M., BETTS, F., RIMNAC, C.M., et SALVATI, E.A. (1994). Generation of polyethylene and metal debris from non articulating surfaces of modular acetabular components in total hip artroplasty. J. Bone Joint Surg., 79-B, 568-574.
53. HUK, O.L., PETIT, A., RALSTON, W., LISBONA, A., et ZUKOR, D.J. (1997). Demonstration of apoptosis in pseudomembranes of failed total hip arthroplasty. J. Bone Joint Surg. (Am), (soumis).

54. JAMES, R.E., MALONEY, W.J., et SMITH, R.L. (1995). The human macrophage response to retrieved titanium alloy particles, AMSFB, 21, 153.
55. JAMES, R.E., MALONEY, W.J., BRAUNSTEIN, D., et SMITH, R.L. (1995). Surface topology of retrieved TiAlV Particulate debris and its effect on the human macrophage cellular membrane. AMSFB, 21, 116.
56. JIRANEK, W.A., MACHADO, M., JASTY, M., JEVSEVAR, D., WOLFE, H.J., GOLDRING, S.R., GOLDBERG, M.J., et HARRIS WH. (1993). Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. Analysis with immunohistochemical techniques and in situ hybridization. J. Bone Joint Surg., 75A, 863-79.
57. JONES, L.C., et HUNGERFORD, D.S. (1987). Cement disease. Clin. Orthop. Rel. Res., 225, 192-206.
58. KERR, J.F (1971). Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. J. Pathol., 105(1), 13-20.
59. KERR, J.F., WYLLIE, A.H., et CURRIE, A.R. (1972), Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-range implications in tissues kinetics. Br. J. Cancer., 26(4), 239-257.

60. KIM, K.J., CHIBA, J., et RUBASH, H.E. (1994). *In vivo* and *in vitro* analysis of membranes from hip prostheses inserted without cement. J. Bone Joint Surg., 76A, 172-180.
61. LALOR, P.A., SHORTKROFF, S., ABERMAN, H.M., VIVEIROS, C., DUMBLETON, J.H., et SLEDGE, C.B. (1994). *In vitro* biocompatibility studies of Ti-6Al-4V and Ti-Mo-Zr-Fe particles, Trans ORS, 40, 850.
62. LENNON S.V., MARTIN, S.J., et COTTER, T.G. (1991). Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. Cell Prolif., 24(2), 203-214.
63. LEROUGE, S., HUK O., YAHIA, L'H., et SEDEL L. (1996). Characterization of *in vivo* wear debris from ceramic-ceramic total hip arthroplasties. J. Biomed. Mater. Res., 32, 627-633.
64. LEROUGE, S., HUK, O., YAHIA, L'H., et SEDEL, L. (1997). Ceramic-ceramic and metal-polyethylene total hip replacements. J. Bone Joint Surg., 79B, 135-139.
65. MAHONEY, O.M., et DIMONM, J.H. (1990). Unsatisfactory results with a ceramic total hip prothesis. J. Bone Joint Surg., 72A, 663-671.
66. MALONEY, W., SMITH, R., CASTRO, F., et SCHURMAN, D. (1993). Fibroblast response to metallic debris *in vitro*. J. Bone Joint Surg., 75A, 835-844.

67. MANLEY, M. et SEREKIAN, P. (1994). Wear debris: an environmental issue in THR. Clin. Orthop. Rel. Res., 298, 137-146.
68. MARGEVICIUS, KJ., BAUER, TW., MCMAHON, JT., BROWN, S.A., et MERRITT, K. (1994). Isolation and characterization of debris in membranes around total joint prostheses. J. Bone and Joint Surg., 76A, 1664-75.
69. MARCINKIEWICZ, J. (1991). In vitro cytokine release by activated murine peritoneal macrophages: role of prostaglandins in the differential regulation of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, interleukin 6. Cytokine, 3(4), 327-32.
70. McDONALD, B.R., et GOWEN, M. (1992). Cytokines and Bone. Br. J. Rheum., 31, 149-155.
71. MEDVEDEV, A.E., SUNDAN, A., et ESPEVIK, T. (1994). Involvement of the tumor necrosis factor receptor p75 in mediating cytotoxicity and gene regulating activities. Eur. J. Immunol., 24(11), 2842-2849.
72. METEZEAU, P.H., RONOT, X., LE NOAN-MERDRIGNAC, G., et RATINAUD, M.H. (1988). La cytométrie en flux pour l'étude de la cellule normale ou pathologique. Vol. 1, Medsi/McGraw-Hill, 357-367.
73. MURRAY, D.W., et RUSHTON, N. (1990). Macrophages stimulate bone resorption when they phagocytose particles. J. Bone Joint Surg., 72B, 988-992.

74. NAKASHIMA, Y., SHUTO, T., HAYASHI, K., HOTOKEBUCHI, T., YASUDA, K., et SUGIOKA, Y. (1995), The stimulatory effects of ceramic particles on the production of the bone resorbing mediators in vitro. Trans ORS, 41, 780.
75. O'LEARY, J.F., MALLORY, T.H., KRAUS, T.J., LOMBARDI, A.V., et LYE, C.L. (1988). Mittelmeir ceramic total hip arthroplasty. A retrospective study. J. Arthroplasty, 3, 8796.
76. PANDEY, R., QUINN, J.M.W., SABOKBAR, A., et ATHANASOU, A. (1996). Bisphosphonate inhibition of bone resorption induced by particulate biomaterial-associated macrophages. Acta Orthop. Scand., 67(3), 221-228.
77. PERONA, B.P., SHORTKROFF, S., INCOGNITO, L., SLEDGE, C.B., et SPECTOR, M. (1992). The response of human macrophages in vitro to selected orthopaedic biomaterial surfaces, Trans ORS, 38, 353.
78. PIZZOFERRATO, A., VESPUCCI, A., GIAPETTI, G., STEA, S., et TARABUSI, C. (1987). The effect of injection of powdered biomaterials on mouse peritoneal cell populations. J. Biomed. Mater. Res., 21, 419-428.
79. PIZZOFERRATO, A., STEA, S., SUDANESE, A., TONI, A., NIGRISOLI, M., GUALTIERI, G., et SQUARZONI, S. (1993). Morphometric and microanalytical analyses of alumina wear particles in hip prostheses. Biomaterials, 14, 583-587.

80. PLITZ, W., et GRISS, P. (1981). Clinical, histomorphological and material related observations on removed alumina-alumina hip joint components. Implant Retrieval: material and biological analysis, Weinstein, Gibbons, Brown & Ruff, eds, NBS special publication 601. US Dept of Commerce, New York, 131-156.
81. RAFF, M.C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. Nature, 356, 397-399.
82. RYU, R.K.N., BOVILL E.G., SKINNER, H.B., et MURRAY W.R. (1987). Soft Tissue Sarcoma Associated with Aluminium Oxide Ceramic Total Hip Arthroplasty. A Case Report. Clin. Orthop. Rel. Res., 216, 207-212.
83. SCHMALZRIED, T.P., JASTY, M., et HARRIS, W.H. (1992). Periprosthetic Bone Loss in Total Hip Arthroplasty. J. Bone Joint Surg., 74A, 849-863.
84. SCHMALZRIED, T., JASTY, M., ROSENBERG, A., et HARRIS, W. (1994). Polyethylene wear debris and tissue reactions in knee as compared to hip replacement prostheses. J. Appl. Biomater., 5, 185-190.
85. SEDEL, L., NIZARD, R., KERBOULL, L., et WITWOET, J. (1994). Alumina-alumina hip replacement in patients younger than 50 years old. Clin. Orthop. Rel. Res., 298, 175-183.

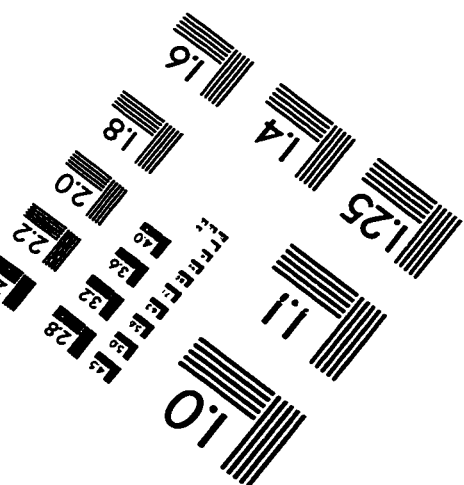
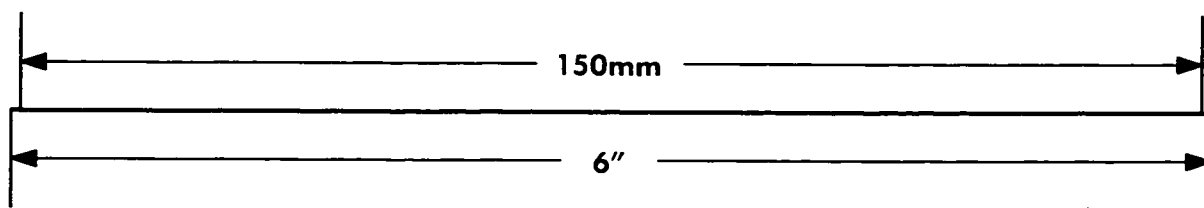
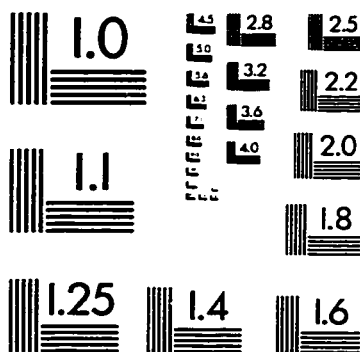
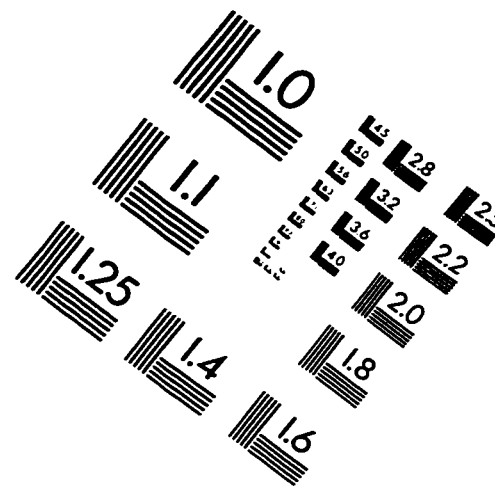
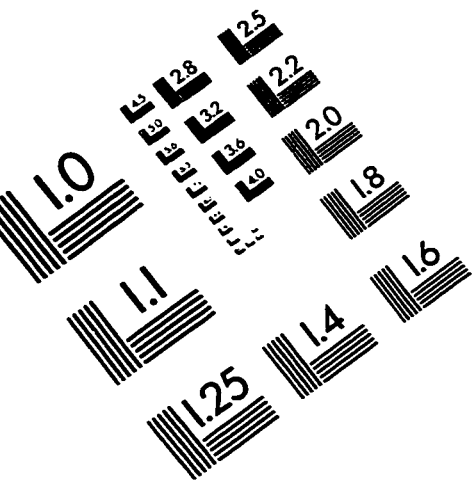
86. SHANBHAG, A.S., GLANT, T.T., JACOBS, J.J., et BLACK, J. (1992). Macrophage stimulation of fibroblast proliferation is affected by size, composition and surface area of particulates, Trans ORS, 38, 342.
87. SHANBHAG A.S., JACOBS J.J., GLANT T.T., GILBERT J.L., BLACK J., et GALANTE J.O. (1994). Composition and morphology of wear debris in failed uncemented total hip replacement. J. Bone Joint Surg., 76B, 60-7.
88. SHANBHAG, A.S., BLACK, J., JACOBS, J.J., GALANTE, J.O., et GLANT, T.T. (1994). Human monocyte response to submicron fabricated and retrieved polyethylene, Ti-6Al-4V and Ti Particles. Trans ORS, 40, 849.
89. SHANBHAG, A.S., JACOBS, J.J., BLACK, J., GALANTE, J.O., et GLANT, T.T. (1994). Macrophage-particle interactions: Effect of size, composition and surface area. J. Biomed. Mater. Res., 28, 81-90.
90. SHANBHAG, A.S., JACOBS, J.J., BLACK, J., GALANTE, J.O., et GLANT, T.T. (1995). Human monocyte response to particulate biomaterials generated in vivo and in vitro. J. Orthop. Res., 13 (5), 792-801.
91. SHANBHAG, A.S., JACOBS, J.J., BLACK, J., GALANTE, J.O., et GLANT, T.T. (1995). Cellular mediators secreted by interfacial membranes obtained at revision total hip arthroplasty. J. Arthroplasty, 10 (4), 498-506.

92. SHANBHAG, A.S., HASSELMAN, C.T., KOVAH, C.J., et RUBASH, H.E. (1997). Inhibition of osteolysis by biphosphonates in a canine total hip arthroplasty (THA) model, Trans ORS, 43, 8.
93. SPECTOR, M., SHORTKROFF, S., HSU, H.P., LANE, N., SLEDGE, C.B., et THORNHILL, T.S. (1991). Tissue changes around loose prostheses. Clin. Orthop. Rel. Res., 261, 140.
94. STELLER H. (1995). Mechanisms and Genes of Cellular Suicide, Science, 267, 1445-1449.
95. SUN, D.Y., JIANG, S., ZHENG, L.M., OJCIUS, O.M., et YOUNG, J.D.E. (1994). Separate metabolic pathways leading to DNA fragmentation and apoptotic chromatin condensation. J. Exp. Med., 179, 559-568.
96. THORNHILL, T., OZUNA, R., SHORTKROFF S., KELLER, K., SLEDGE, C., et SPECTOR, M. (1990). Biochemical and histological evaluation of the synovial -like tissue around failed total joint replacement prostheses in human subjects and a canine model. Biomaterials, 11, 69-74.
97. THOMPSON, C.B. (1995). Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. Science, 267, 1456-1462.

98. UREN, A.G., et VAUX, D.L. (1996). Molecular and Clinical Aspects of Apoptosis. Pharmacol. Ther., 72(1), 37-50.
99. WANG, JT, BENETT, N.E., et GOLDRING, S.R. (1992). Molecular mechanisms involved in activation of cells by particulate orthopedic implant biomaterials. Trans ORS, 38, 43.
100. WANG, J.Y., et al. (1996). Titanium, chromium and cobalt ions modulate the release of bone-associated cytokines by human monocytes/macrophages in vitro, Biomaterials, 17(23), 2233-2240.
101. WILLERT, H.G., LUDWIG, J., et SEMLITSCH. (1974). Reaction of bone to methacrylate. J. Bone Joint Surg., 56A, 1368-1382.
102. XU, J.W., KONTTINEN, Y.T., LASSUS, J., NATAH, S., CEPONIS, A., SOLOVIEVA, S., ASPENBERG, P., et SANTAVIRTA, S. (1996), Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in loosening of total hip replacement (THR). Clin. Exp. Rheumatol., 14 (6), 643-648.
103. YAPARPALVI, R., LOYALKA, S.K., et TOMPSON, J.R. (1994). Production of spherical ZrO_2 - Y_2O_3 and ZnO particles. J. Biomed. Mater. Res., 28, 1087-1093.

104. ZHENG, L., FISHER, G., MILLER, R.E., PESCHON, J., LYNCH, D.H., et LENARDO, M.J. (1995). Induction of apoptosis in mature T cells by tumor necrosis factor. Nature, 377(6547), 348-351.
105. ZYCHLMSKY, A., FITTING, C., CAVAILLON, J.M., et SANSONETTI, P.J. (1994). Interleukin 1 is release by murine macrophages during apoptosis induced by *Shigella flexneri*. J. Clin. Invest., 94(3), 1328-1332.

IMAGE EVALUATION TEST TARGET (QA-3)



APPLIED IMAGE, Inc
1653 East Main Street
Rochester, NY 14609 USA
Phone: 716/482-0300
Fax: 716/288-5989

© 1993, Applied Image, Inc., All Rights Reserved

